

Kirstern Lica Follmann Haseyama

Filogenia e tempos de divergência de Muscidae (Diptera, Calyptratae, Schizophora)

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração em Entomologia) da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientador:

Claudio José Barros de Carvalho

Co-orientadores:

Eduardo Andrade Botelho de Almeida (USP)

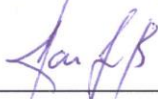
Brian Michael Wiegmann (NCSU)

Curitiba, março de 2014

KIRSTERN LICA FOLLMANN HASEYAMA

"Filogenia e tempos de divergência de Muscidae (Diptera, Calypttratae, Schizophora)"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em Ciências", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



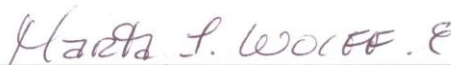
Prof. Dr. Claudio José Barros de Carvalho (Orientador)
(UFPR)



Prof. Dr. Eduardo Andrade Botelho de Almeida
(USP)



Profa. Dra. Márcia Souto Couri
(UFRJ)



Profa. Dra. Martha Isabel Wolff Echeverri
(Universidade de Antioquia-Colômbia)



Prof. Dr. Silvio Shigue Nihei
(USP)

Curitiba, 24 de abril de 2014.

Agradecimentos

Agradeço às instituições que apoiaram este trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de doutorado; ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa no período inicial do doutorado, pela oportunidade de visitar o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo Programa Nacional de Cooperação Acadêmica, e durante a minha estadia no exterior, pelo programa de Doutorado Sanduíche; à Universidade Federal do Paraná, o Departamento de Zoologia e o Programa de Pós-graduação em Entomologia por oferecer as condições necessárias para o período do doutorado realizado em território nacional; à *North Carolina State University* e o seu Departamento de Entomologia por possibilitar a execução de parte do trabalho durante os 11 meses nela passados.

Ao meu orientador, Claudio José Barros de Carvalho, pela orientação sobre moscas, o mundo acadêmico, a minha carreira e tantas outras coisas, desde a graduação até agora. Foram incontáveis horas, todas elas muito bem gastas, passadas na frente da lupa conferindo todos os espécimes identificados, no computador, nos livros ou conversando. Ao meu co-orientador, Eduardo Andrade Botelho de Almeida, por sempre estar a postos, mesmo à distância, para tirar toda a sorte de dúvidas a respeito de biogeografia e filogenética, também desde a graduação. Ao meu co-orientador Brian Michael Wiegmann, por sempre me ajudar com as análises, organizar os planos futuros, pela sua visão sempre ampla e objetiva do trabalho, e pela paciência quando eu queria apresentá-lo a cada nova topologia gerada. A estas três pessoas devo o suporte da minha formação acadêmica nesses últimos quatro anos.

Às pessoas que muito me ensinaram nesses quatro anos, e também anteriormente no mestrado e graduação, meus professores e colegas tanto na UFPR quanto na NCSU. Agradeço especialmente aos que a mim se juntaram em cada tentativa de ressuscitar o Cladson, nosso estimado grupo de discussão. E também, claro, os meus colegas de laboratório, que tiveram muita paciência quando eu praticamente tomei uma lupa para mim e lotei o congelador: Alessandre, André, Bia, Danilo, Diana, Gustavo, João, Juliana, Karine, Keith, Kiany, Lyvia, Maíra, Marcelo, Mauren, Mírian, Rafael, Rosângela, Tatiana, Victor. Também ao Brian C. Cassel, técnico que me ensinou, durante o meu estágio sanduíche, as técnicas necessárias para a obtenção das sequências de DNA.

Aos meus colaboradores nos artigos e matérias publicados e em preparação no período, assim como os revisores e editores. Todas as discussões com os autores e as críticas construtivas recebidas foram extremamente úteis. Alexandre Pereira Colavite, Claudio José Barros de Carvalho, Danilo Pacheco Cordeiro, Diana Lucia Grisales, Marcos Barbeitos, Mário Luis Pessoa Guedes, Peter Löwenberg-Neto, Rudolf Meier, Silvio Shigueo Nihei, Alessandra Rung Chaves, e revisores anônimos.

Claro, aos coletores, e pesquisadores que abriram que abriram as portas de seus laboratórios e coleções para que eu pudesse triar material. Adolfo Callor e colaboradores, Ashton Kirk-Sprigs, Brian Wiegmann, Cecília Kosmann, Claudivã S. Maia, Danilo P. Cordeiro, David Yeates, Diana G. Ochoa, Fernando Leivas, Flávia Fernandes, Guilherme Ide, Jéssica H. Viana, José Albertino Rafael e colaboradores, Justin B. Runyon, Karine P. e Vairo, Leandro Santos, Lucas Cezar, Luis R. R. Faria Jr., Marc Pollet e colaboradores, Mário L. P. Guedes, Marion Kotbra, Paschoal Grossi, Ricardo Kawada, Rodrigo Krüger e colaboradores, Rosaly Ale-Rocha e colaboradores, Satoshi Shinonaga, Silvio Nihei e colaboradores e Thayana Monteiro. Agradeço especialmente os esforços empregados por Jorge Almeida, para a obtenção do espécime de *Achanthiptera* utilizado neste trabalho. Se você coletou material para mim, e seu nome não se encontra nesta lista, peço que me desculpe. Ou seu nome está sob o desígnio de “e colaboradores” ou seu material não foi usado na fase final do trabalho. No entanto, todo material foi triado e identificado ao menor nível possível no momento, está apropriadamente armazenado, e espera-se será utilizado em futuros trabalhos. Agradeço especialmente a Mirian N. Morales, cujo material africano e europeu está guardado a espera de novos projetos.

Aos que me auxiliaram na identificação dos espécimes: Alexandre P. Colavite e suas *Neomuscina*, Adrian Pont pelos conselhos dados na identificação de material Paleártico, André C. Silva com os Anthomyiidae, Satoshi Shinonaga que muito gentilmente enviou do Japão diversos Muscidae identificados e Silvio S. Nihei pela ajuda com os Muscini. E claro, o prof. Claudio, que passou todas aquelas manhãs olhando todos os espécimes utilizados.

As pessoas que me apoiaram durante algumas das viagens feitas nesses quatro anos: Jéssica Gilung, Júlia C. Almeida, Lucas Cezar, Roberta Figueiredo e Silvio Nihei, que me ajudaram nas coletas na Costa Rica, e também Diana Grisales e Marta Wolff pela companhia durante a estadia em San José no VII *International Congress of Dipterology*; Cinthia Chagas, Edgar Alvin, Danilo P. Cordeiro, Diana L. Grisales, Francisco X. Filho, Gabriel A. Melo, Mário P. Guedes, Raimundo N. Costa, Rodrigo Vieira, José A. Rafael e Rosaly Ale-Rocha e

os integrantes de seus laboratórios, por proporcionar o apoio para o trabalho ou pela paciência de passar um mês comigo em Manaus, durante o PROCAD; Mauren Turcatel e Frederico D. Kirst, pessoas indispensáveis no período do estágio sanduíche, claro também Brian M. Wiegmann, Brian C. Cassel e Keith M. Bayless, e Mirian N. Mendonça e Olivia Evangelista por todas as dicas no período antes da viagem; aos integrantes do Wiegmann lab e o Frederico Kirst, pelos 1000 km viajados em uma mini-van rumo ao encontro da *North American Dipterists Society*, e ao Eric Fisher pelas dicas e apoio ao projeto após a minha apresentação no encontro. Torsten Dikow e Raymond Gagne, que abriram as portas da coleção de Diptera do *Smithsonian Insitute* e Christian Thompson, que recebeu muito bem a mim e ao Frederico; ao time de professores e colegas dos principais cursos de formação complementar no período: III Workshop em Sistemática Filogenética promovido pela *Willi Hennig Society* e XXVI Workshop em Evolução Molecular, principalmente ao Brian Wiegmann pelo financiamento do último e Diana L. Grisales, Eduardo A.B. Almeida e Mauren Turcatel pela companhia durante estes eventos.

Andressa Paladini por revisar a primeira versão da tese e todas as discussões anteriores. A Adrian Pont, pelo apoio ao longo da execução do projeto.

Finalmente, aos professores Márcia S. Couri, Marta Wolff, Silvio S. Nihei, Eduardo A. B. de Almeida e Marcio R. Pie, que aceitaram o convite para participar da banca examinadora.

Sumário

Agradecimentos.....	ii
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos	
2.1 Amostragem, escolha dos genes e desenho da composição da matriz de dados.....	6
2.2 Extração do DNA, amplificação e sequenciamento.....	8
2.3 Alinhamento, escolhas dos modelos e outras análises.....	10
2.4 Análises filogenéticas.....	12
2.5 Estimativa dos tempos de divergência.....	14
Resultados	
3.1 Análises preliminares.....	15
3.2 Inferência filogenética e estimativa dos tempos de divergência.....	17
Discussão	
4.1 Inferência filogenética.....	18
4.2 Discussão taxonômica.....	21
4.3 Tempos de divergência.....	27
Considerações finais.....	31
Referências.....	32
Tabelas.....	41
Figuras.....	56

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequências utilizadas e números de acesso ao GenBank.....	41
Tabela 2. Iniciadores utilizados no trabalho, com suas respectivas sequências e referências.....	50
Tabela 3. Resumo das análises filogenéticas e resultados.....	51
Tabela 4. Modelos indicados para cada gene ou partição, de acordo com os testes de AIC e BIC.....	52
Tabela 5. Valores do desvio padrão das <i>split frequencies</i> médias e máximas.....	52
Tabela 6. Valores de verossimilhança marginal obtidos pelo método da média harmônica, por esquema de particionamento, para o conjunto de dados reduzido e completo.....	52
Tabela 7. Comparação dos fatores de Bayes, usando as verossimilhanças marginais obtidas pelo método da média harmônica, entre os esquemas de particionamento, para os dados reduzidos e completos.....	53
Tabela 8. Valores da verossimilhança marginal recuperados pelo procedimento de “ <i>stepping-stone</i> ”, por esquema de particionamento, para o conjunto de dados reduzido e completo.....	53
Tabela 9. Comparação dos fatores de Bayes, usando as verossimilhanças marginais obtidas pelo procedimento de “ <i>stepping-stone</i> ”, entre os esquemas de particionamento, para o conjunto de dados reduzido e completo.....	53
Tabela 10. Comparação entre a classificação atual e a proposta deste trabalho.....	54

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Plots</i> de saturação.....	56
Figura 2. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘SP_RED’ obtidas pela probabilidade posterior bayesiana	57
Figura 3. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘GENE_RED’ obtidas pela probabilidade posterior bayesiana	58
Figura 4. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘GENE123_RED’ obtidas pela probabilidade posterior bayesiana ...	59
Figura 5. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘CO1s3_RED’ obtidas pela probabilidade posterior bayesiana	60
Figura 6. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘SP_COMP’ obtidas pela probabilidade posterior bayesiana	61
Figura 7. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘GENE_COMP’ obtidas pela probabilidade posterior bayesiana	62
Figura 8. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘GENE123_COMP’ obtidas pela probabilidade posterior bayesiana	63
Figura 9. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘CO1s3_COMP’ obtidas pela probabilidade posterior bayesiana	64
Figura 10. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘SP_RED’ obtidas pela máxima verossimilhança.....	65
Figura 11. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘GENE_RED’ obtidas pela máxima verossimilhança.....	66
Figura 12. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘GENE123_RED’ obtidas pela máxima verossimilhança.....	67
Figura 13. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘CO1s3_RED’ obtidas pela máxima verossimilhança.....	68
Figura 14. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘SP_COMP’ obtidas pela máxima verossimilhança.....	69
Figura 15. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de	

particionamento ‘GENE_COMP’ obtidas pela máxima verossimilhança.....	70
Figura 16. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘123GENE_COMP’ obtidas pela máxima verossimilhança.....	71
Figura 17. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘CO1s3_COMP’ obtidas pela máxima verossimilhança.....	72
Figura 18. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘SP_RED’ obtidas pela parcimônia.....	73
Figura 19. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘CO1s3_RED’ obtidas pela parcimônia.....	74
Figura 20. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘SP_COMP’ obtidas pela parcimônia.....	75
Figura 21. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de <i>bootstrap</i> para o esquema de particionamento ‘CO1s3_COMP’ obtidas pela parcimônia.....	76
Figura 22. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e intervalos de 95% de confiança para os tempos de divergência obtidos com o esquema de particionamento ‘GENE_RED’.....	77
Figura 23. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e intervalos de 95% de confiança para os tempos de divergência obtidos com o esquema de particionamento ‘GENE_COMP’.....	78
Figura 24. Resumo dos suportes obtidos por todas as análises reduzidas para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae, mapeados sobre a hipótese filogenética obtida pelo esquema de particionamento ‘GENE’, pela probabilidade posterior bayesiana	79
Figura 25. Resumo dos suportes obtidos por todas as análises para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae, mapeados sobre a hipótese filogenética obtida pelo esquema de particionamento ‘SP’, pela probabilidade posterior bayesiana	80
Figura 26. Comparação entre as principais hipóteses filogenéticas para Muscidae	83

Resumo

Muscidae é uma família de moscas de distribuição cosmopolita, com aproximadamente 5000 espécies distribuídas em 200 gêneros. A classificação atual divide a família em oito subfamílias, mas estudos prévios, tanto com caracteres morfológicos de adultos, imaturos e também moleculares, dão suporte a diferentes hipóteses de relacionamento e composição destes grupos. Para propor uma hipótese para o relacionamento filogenético entre as principais linhagens de Muscidae, bem como os tempos de divergência entre elas, foram utilizados dados de 138 espécies da família, representando 62 gêneros distribuídos em todas as subfamílias e tribos, exceto Eginini, provenientes de todas as regiões biogeográficas, mas com especial ênfase na Neotropical. As análises filogenéticas foram feitas com dados de quatro genes (CO1, AATS, CAD e EF1 α) e submetidos a análise pelos critérios de máxima verossimilhança, parcimônia e probabilidades posteriores bayesianas. Os tempos de divergência foram calculados pelo método bayesiano. Os resultados encontrados mostram uma divisão principal da família em três linhagens: uma correspondente a Muscinae, que inclui além de Muscini e Stomoxyini, Azeliini, Achanthipterinae e *Reinwardtia*, sendo a inclusão deste último duvidosa pela instabilidade quanto ao seu posicionamento em diferentes análises; uma segunda linhagem correspondente a Cyrtoneurinae, composta por representantes desta subfamília, Mydaeinae, os demais Reinwardtiini e Atherigoninae; a última linhagem corresponde a Mydaeinae, e além destes engloba os Phaoniinae, Dichaetomyiini, Coenosiini e Limnophorini. *Cariocamyia* (um Cyrtoneurinae neotropical), e *Prohardyia* (um Phaoniinae australiano) posicionaram-se neste clado, mas em diversas análises eles foram recuperados junto aos Cyrtoneurinae. Em algumas análises, *Cariocamyia* e *Prohardyia* foram encontrados como gêneros irmãos. Uma discussão a respeito do posicionamento de diversos gêneros também é apresentada. A divergência entre Muscidae e Anthomyiidae foi calculada entre 50 e 60 milhões de anos, correspondente a um período entre o Paleoceno superior e o Eoceno inferior, e as principais linhagens de Muscidae divergiram entre 50 e 35 milhões de anos.

Abstract

Muscidae is a family of flies with worldwide distribution, comprising about 5000 species in 200 genera. The current classification of house flies divides their members into eight subfamilies. Previous studies based on both adult and immature stages morphology and molecular characters support different hypothesis for the relationships and composition of these groups. Herein we present a hypothesis on the relationships within the main lineages of the family, as well as their divergence time estimation for the main clades. A total of 138 muscid species from 62 genera from all subfamilies and tribes (except for Eginini) were sampled for this study. They are representative of all biogeographic regions, in particular from the Neotropical Region. Phylogenetic analyses were carried out with data from four genes (CO1, AATS, CAD e EF1 α) under Bayesian posterior probabilities, maximum likelihood and parsimony criteria. Divergence times were estimated using the Bayesian method. Results recovered three main lineages: one corresponding to the Muscinae, which includes Muscini and Stomoxyini, Azeliini, Achantipterinae and *Reinwardtia*. This genus changed its position among different analyses, so its position within the Muscinae is doubtful; a second lineage corresponds to the Cyrtoneurinae, and is composed by the majority of the representatives of this subfamily, Mydaeinae, the remaining Reinwardtiini and Atherigoninae; the last lineage corresponds to the Mydaeinae, and besides representatives of this subfamily, comprises the Phaoniinae, Dichaetomyiini, Coenosiini, and Limnophorini. *Cariocamyia* (a Neotropical Cyrtoneurinae), as well as *Prohardyia* (an Australian Phaoniinae) were positioned in this clade, but in several analyses they were recovered within the Cyrtoneurinae. In some analyses, *Cariocamyia* and *Prohardyia* were recovered as sister-genera. The divergence between Muscidae and Anthomyiidae was estimated between 50 and 60 million years, corresponding to a period between upper Paleocene and lower Eocene. The main lineages of Muscidae diverged between 50 and 35 million years.

1. Introdução

Muscidae é uma família de moscas com mais de 5000 espécies distribuídas em 200 gêneros (Pape & Thompson 2013), e dentre os dípteros, é uma família relativamente bem estudada. Sua monofilia foi recuperada por diversos estudos, tanto pela análise da morfologia (Michelsen 1999), quanto análises utilizando o princípio filogenético com dados morfológicos (Hennig 1965, McAlpine 1989) e também com dados moleculares (Kutty *et al.* 2008, 2010). A sua autapomorfia mais importante é a perda dos espiráculos pós abdominais na fêmea, mas *Cariocamyia* e *Achanthiptera* readquiriram independentemente o espiráculo 6 (Hennig 1965).

Vários autores construíram propostas de classificação, baseados tanto em análises da morfologia quanto em hipóteses filogenéticas. A classificação mais recente divide a família em oito subfamílias: Achanthipterinae Rondani, 1856, Atherigoninae Fan, 1965, Azeliinae Robineau-Desvoidy, 1830, com as tribos Azeliini Robineau-Desvoidy, 1830 e Reinwardtiini Brauer & Bergenstamm, 1889, Coenosiinae Verrall, 1888, subdividido em Coenosiini Verrall, 1890 e Limnophorini Villeneuve, 1902, Cyrtoneurinae Snyder, 1954, Muscinae Latreille, 1802, constituído por Muscini Latreille, 1802 e Stomoxyini Meigen, 1824, Mydaeinae Verrall, 1888 e Phaoniinae Malloch, 1917 (Carvalho *et al.* 2005). Esta proposta, baseada em uma análise filogenética com caracteres morfológicos de adultos (Carvalho 1989), é em grande parte condizente com aquela baseada no extensivo estudo de caracteres dos estágios imaturos (Skidmore 1985). Uma diferença importante entre estas classificações é o posicionamento de Eginini. Carvalho (1989) considerou os gêneros reunidos em Eginini como não pertencentes à Muscidae, seguindo o posicionamento de Hennig (1973), que considerou as espécies deste táxon como uma família separada, pela presença de cerdas no mero e veia anal se estendendo até a margem da asa. Por outro lado, McAlpine (1989), mantém o grupo em Muscidae, pela ausência dos espiráculos seis e sete nas fêmeas (autapomorfia da família), além de caracteres da genitália masculina. Pont (1986) alocou estas espécies na subfamília Phaoniinae, tribo Eginini. Por outro lado, em sua classificação, Skidmore (1985) mantém o grupo como uma subfamília de Muscidae, deixando claro, porém, que o provavelmente não pertence à família.

Duas hipóteses filogenéticas utilizando dados morfológicos já foram propostas para a família. A primeira foi constituída por Hennig (1965), que apesar de formalmente não ter

apresentado uma árvore filogenética, fez um extenso trabalho de revisão da literatura e de análise morfológica, principalmente dos adultos. Na mais recentemente proposta, Carvalho (1989) amostrou 27 espécies terminais pertencentes a nove das dez subfamílias reconhecidas para Muscidae à época, já que Eginini, tratada pelo autor como Egininae, não foi utilizada. As principais diferenças entre os trabalhos de Hennig (1965) e Carvalho (1989) são: a posição de Azeliinae (naquele trabalho tratada como Hydrotaeini), que no primeiro compõe uma tribo de Muscinae; Atherigoninae, que no primeiro é um gênero sem posição definida, possivelmente relacionado a Phaoniinae, assim como Dichaetomyiini; Coenosiini e Limnophorini, que no trabalho mais antigo constituem subfamílias; Cyrtoneurinae, que no trabalho mais antigo foi tratado como uma subfamília de posicionamento incerto; e Stomoxyini, a qual Hennig considerou como proximamente relacionada a Glossinidae e Hippoboscidae, por caracteres da proboscídeas, e sem um posicionamento definido dentro da família; Reinwardtiini, que no esquema de Hennig não tem o status de táxon: *Reinwardtia* é posicionada por ele em Muscinae e os demais gêneros da tribo em Phaoniinae. Apesar das diferenças na composição das subfamílias, nas duas hipóteses Acanthipterinae, Muscinae e Azeliinae divergiram anteriormente em relação a Phaoniinae, Mydaeinae e Coenosiinae.

Existem também hipóteses para os relacionamentos intrafamiliares propostas com dados moleculares. Schuehli *et al.* (2007) amostraram 24 terminais de cinco subfamílias e utilizaram quatro genes (CO1, CO2, EF1 α e CAD). Neste trabalho, os resultados foram congruentes com a monofilia de apenas duas subfamílias, Muscinae e Phaoniinae. Kutty *et al.* (2008) trabalharam com a filogenia de “Muscoidea” (McAlpine 1989), um agrupamento parafilético em relação aos demais Calyptratae, constituído pelas famílias Anthomyiidae, Fanniidae, Muscidae e Scathophagidae. Foram utilizadas 46 espécies de Muscidae, em sua maioria paleárticas, amostrando sete subfamílias. Os autores analisaram dados de oito genes (12S, 16S, 18S, 28S, CO1, CYT, EF1 α e CAD), e apenas Coenosiinae e Muscinae foram consideradas monofiléticas (Kutty *et al.* 2008). Subsequentemente, estes dados foram reanalisados em um trabalho que tinha como objetivo criar uma hipótese a respeito dos relacionamentos entre os Calyptratae, e apenas Coenosiinae foi reconhecida como monofilética (Kutty *et al.* 2010).

Além destes estudos abrangentes, há filogenias morfológicas de alguns subgrupos de Muscidae: Coenosiini (Couri & Pont 2000), Azeliini (Savage & Wheeler 2004), Muscini (Nihei

& Carvalho 2007a) e Reinwardtiini (Soares 2008). Há também um estudo a respeito das relações entre *Philornis*, *Passeromyia* e gêneros próximos, juntamente com representantes de diversas subfamílias de Muscidae (Couri & Carvalho 2003). Nesta publicação os autores sugeriram que os gêneros de Cyrtoneurinae poderiam ser incluídos em Dichaetomyiini, um grupo Paleotropical, Paleártico e Australiano, não incluso no sistema de Carvalho (1989), e que usualmente é tratado como tribo de Phaoninae (*e.g.* Hennig 1965). Naquele trabalho, no entanto, o grupo é tratado como subfamília e não forma um clado com Phaoninae. Foram publicadas também duas abordagens moleculares: de Reinwardtiini, onde foram utilizados 36 terminais e três genes (CAD, CO1 e CO2), resultando em Coenosiinae e Phaoniinae monofiléticas (Soares 2008), e um estudo englobando diversas espécies de *Stomoxys* e representantes de *Haematobia*, *Haematobosca*, *Prostomoxys* (todos Stomoxyini) e *Musca* (Muscini), com três genes (CO1, CYTB e ITS2), onde a monofilia de Stomoxyini foi recuperada (Dsouli *et al.* 2011).

Considerando em conjunto os cinco estudos com dados moleculares (Schuehli *et al.* 2007, Soares 2008, Kutty *et al.* 2008, 2010, Dsouli *et al.* 2011), todas as subfamílias e tribos estão amostradas, com exceção de Eginiini, Dichaetomyiini e Achanthipterinae, a qual possui apenas *Achanthiptera rohrelliformis*, de distribuição Paleártica.

À parte os relacionamentos intrafamiliares, outro aspecto bastante discutido e controverso com relação à Muscidae é a sua idade. Diversos autores têm proposto estimativas de tempos de divergência baseadas em diferentes metodologias, mas principalmente embasados em dados de distribuição e análises biogeográficas. Hennig (1965) propôs que a família teria se originado no Cretáceo Superior (65-99 milhões de anos - MA) baseado no padrão de distribuição da família. Os muscídeos teriam chegado ao hemisfério sul por dispersão a partir dos continentes do norte. Michelsen (1991) sustenta esta ideia para Anthomyiidae, que de acordo com o autor, é grupo irmão de Muscidae. Já Couri & Carvalho (2003), através da análise filogenética e biogeográfica parcial da família propuseram um padrão gondwânico para explicar o relacionamento próximo entre gêneros neotropicais e paleotropicais, reduzindo então a idade da família para o Cretáceo Inferior (99-145 MA). No entanto, os autores reforçam que a idade da família continua incerta. Outra perspectiva foi dada por Löwenberg-Neto *et al.* (2011), cujos resultados mostram que a história evolutiva de Muscidae, ao menos na América do Sul, pode ser explicada pela Hipótese de Conservação Tropical. Esta hipótese procura explicar a alta diversidade de táxons nas regiões

quentes do mundo, argumentando que as regiões frias são mais recentes, e por isso possuem menos linhagens adaptadas a sobreviver nestes locais. Assim, o conservantismo de nicho nos locais mais quentes do continente e o resfriamento da região Andina ocorrido no Cenozóico, explicaria a evolução de Muscidae na região. Apesar desta hipótese não estabelecer uma idade para a família como um todo, denota que as linhagens adaptadas às regiões mais frias teriam tido uma evolução bastante recente, ao menos na região Neotropical.

Uma forma alternativa para se estimar as idades mínimas de grupos é pela idade de fósseis pertencentes a um clado. No entanto, o registro fóssil de Muscidae é escasso. Pont & Carvalho (1997) descreveram três espécies encontradas no âmbar Dominicano, cuja idade é estimada entre 15 a 20 MA (Iturralde-Vinent & MacPhee 1996): *Phaonia succini* e *Phaonia electrica* (Phaoniinae), que pertencem a um gênero atual, e *Archaeopolietes tertiaria* (Muscinae), única espécie conhecida do gênero, que parece estar extinto. Além destes três fósseis bem documentados, ainda há registros entre o Oligoceno e o Holoceno que não oferecem suficiente evidência morfológica para identificação segura (Adrian Pont, comunicação pessoal). Das famílias do grado Muscoidea, Anthomyiidae possui o fóssil mais antigo (Michelsen 2000, Evenhuis 2004), com idade estimada em 44 MA.

A primeira estimativa de tempos de divergência entre Diptera baseada em dados moleculares foi feita por Wiegmann *et al.* (2003), que calcularam, entre outros, o tempo de divergência entre os gêneros *Musca* (Muscidae) e *Drosophila* (Drosophilidae), representando a radiação de Schizophora, a qual teria ocorrido entre 81 e 48 MA (Cretáceo superior ao Eoceno médio). Os próprios autores ressaltam, no entanto, que uma estimativa da idade de Muscidae, que estava fora do escopo daquele trabalho, só seria possível com a utilização do grupo-irmão apropriado. Recentemente, utilizando terminais representando as principais linhagens de Diptera, incluindo várias famílias de Calyptratae e todas as do grado Muscoidea, a idade da radiação de Muscidae foi calculada como tendo ocorrido há cerca de 50 MA (Wiegmann *et al.* 2011). Em outro estudo foram estimados também os tempos de divergência entre espécies de *Stomoxys*, alguns outros gêneros dentro de Stomoxyini e *Musca* (Dsouli *et al.* 2011). O tempo de divergência estimado para *Stomoxys* foi entre 40 e 20 MA, e a divergência entre Muscini e Stomoxyini entre 44 e 25 MA. Como Stomoxyini não possui registro fóssil conhecido, os autores utilizaram grupos externos bastante distantes para fazer a calibração (Dolichopodidae, Syrphidae

e Drosophilidae), além da estimativa obtida anteriormente para a divergência de Schizophora (Wiegmann *et al.* 2003).

As relações entre os Calyptratae é um questão em aberto, e não há acordo na literatura sobre qual seria o grupo irmão de Muscidae, havendo quatro principais propostas: 1) Anthomyiidae (Michelsen 1991, Nihei & Carvalho 2004); 2) Fanniidae (Hennig 1973, McAlpine 1989); 3) um clado composto pela superfamília Oestroidea, e as famílias irmãs Scatophagidae e Anthomyiidae, hipótese esta recorrentemente recuperada por estudos com dados moleculares (Bernasconi *et al.* 2000, Kutty *et al.* 2008, 2010, Wiegmann *et al.* 2011). Neste último cenário, Fanniidae é a família irmã das linhagens citadas; 4) Oestroidea, hipótese suportada tanto por uma filogenia com dados morfológicos (Lambkin *et al.* 2013), onde Anthomyiidae era grupo irmão de Muscidae + Oestroidea (Fanniidae não foi incluída na análise), quanto por uma filogenia inferida por genomas mitocondriais (Zhao *et al.* 2013). Neste último trabalho, no entanto, onde Fanniidae e Anthomyiidae não foram inclusos, os autores encontraram tanto suporte para Muscidae como grupo irmão de Oestroidea, pelo critério bayesiano, quanto para um posicionamento de Muscidae dentro de Oestroidea, quando o critério foi a máxima verossimilhança. Neste caso, Oestridae foi recuperado como grupo irmão do clado (Muscidae, (Sarcophagidae + Calliphoridae)).

Neste contexto, em que as relações entre as principais linhagens de Muscidae, apesar de todos os esforços empregados, ainda não estão esclarecidas, o objetivo principal é propor uma hipótese para as relações filogenéticas em Muscidae e estimativas de idades para os eventos de cladogênese. Como objetivos específicos, pretende-se amostrar pela primeira vez, em uma única análise, todas as subfamílias e tribos da família, à exceção de Eginini; analisar um maior número de táxons terminais de linhagens neotropicais, claramente subamostradas em estudos anteriores; propor uma idade para as principais linhagens da família utilizando uma combinação de dados moleculares e registro fóssil; propor uma classificação para a família com base na hipótese filogenética resultante.

2. Material e métodos

2.1 Amostragem, escolha dos genes e desenho da composição da matriz de dados

Para a classificação *a priori* do grupo interno em subfamílias e tribos seguiu-se a proposta do catálogo de Muscidae para a região Neotropical (Carvalho *et al.* 2005) com a adição da subfamília Achanthipterinae e a divisão de Phaoninae em Phaoniini e Dichaetomyiini. Para gêneros presentes exclusivamente em outras regiões, foram utilizados catálogos correspondentes (Pont 1980, 1986, Evenhuis 2014). Os espécimes foram identificados quando possível até espécie, usando chaves para a identificação de gêneros (*e.g.* Zimin & Eldberg 1988, Carvalho 2002, Gregor *et al.* 2002, Couri 2007, 2010, Nihei & Carvalho 2009) e espécies (*e.g.* Pont 1966, 1969, Carvalho 2002, Savage 2003, Schuehli & Carvalho 2004, Nihei & Carvalho 2007b, Pereira-Colavite & Carvalho 2012). Posteriormente as espécies foram confirmadas com material depositado na Coleção Entomológica Padre Jesus de Santiago Moure (DZUP) e no *Smithsonian Institution* (USNM).

As amostras procedem de localidades principalmente das regiões Neotropical e Paleártica, mas também Neártica, Paleotropical e Australasiana (Tabela 1) e foram coletadas por diversos colaboradores entre 2008 e 2012. O material foi adquirido de forma ativa ou com a ajuda de armadilhas, especialmente Malaise e van Someren, e preservado em álcool. Todos os vouchers estão depositados no DZUP. Foram também usadas diversas sequências disponíveis no GenBank, tanto de Muscidae quanto dos grupos externos, somando 141 espécies de Muscidae, em 63 gêneros, representando todas as suas subfamílias e tribos, exceto Egiiniini (Tabela 1). Como grupos externos foram utilizadas nove espécies de Fanniidae e Anthomyiidae, as quais são as famílias mais próximas de Muscidae de acordo a maior parte das propostas encontradas na literatura.

Algumas considerações foram feitas na escolha dos genes a serem amplificados: 1) privilegiaram-se aqueles com diversas sequências disponíveis no GenBank para Muscidae, e que tivessem iniciadores (*primers*), gerais ou específicos para a família, previamente publicados; 2) deu-se preferência para genes mitocondriais e nucleares codificadores de proteínas, pela facilidade do alinhamento das suas sequências (Wiegmann *et al.* 2000); 3) como o foco deste estudo são as relações entre as linhagens principais e os gêneros de Muscidae, optou-se por

utilizar mais genes nucleares, os quais possuem uma taxa de evolução de cinco a dez vezes mais lenta do que os mitocondriais em animais (Brown *et al.* 1979), e por consequência são mais conservados.

Desta forma, foram utilizados o gene mitocondrial Citocromo Oxidase 1 (CO1) e os seguintes genes nucleares codificadores de proteína: Aspartil-tRNA Sintetase (AATS), o domínio Carbamoil Fosfato Sintetase (CAD, fragmento 4) e Fator de Elongação (EF1 α). Todos figuram entre os mais comuns para reconstrução filogenética em Diptera (Gibson *et al.* 2011) e foram previamente utilizados em estudos filogenéticos que incluem espécies de Muscidae (*e.g.* Schuehli *et al.* 2007, Kutty *et al.* 2008, 2010, Wiegmann *et al.* 2011). O AATS não possui muitas sequências de interesse no GenBank, e no entanto foi escolhido por ser um gene amplamente utilizado na reconstrução filogenética em Diptera (*e.g.* Dikow 2009, Gibson *et al.* 2010, Wiegmann *et al.* 2011), e de fácil amplificação, comparado a outros genes nucleares, ao menos para Muscidae.

Quanto ao desenho da composição da matriz de dados, optou-se por não fazer a amplificação de todos os genes para todas as espécies utilizadas no trabalho, seguindo a estratégia proposta por Wiens *et al.* (2005). Os táxons foram divididos em duas categorias: uma com todas as espécies de interesse e outra com uma espécie para cada gênero. No caso do gênero possuir mais de uma espécie disponível para a extração e amplificação do DNA, optou-se, para a segunda categoria, quando possível, pela espécie tipo. Quando esta não estava disponível, foi escolhido o material que potencialmente tivesse o DNA mais bem conservado, considerando data e método de coleta. As espécies que se encaixavam apenas na primeira categoria tiveram somente o CO1 amplificado. Já aquelas que se encaixavam na segunda passaram pela tentativa de amplificação de todos os genes envolvidos no estudo. A escolha deste desenho experimental teve como motivação, além do corte substancial de custos e de tempo de laboratório, a hipótese de que as sequências dos genes nucleares em espécies selecionadas seriam o suficiente para garantir a estrutura dos nós mais internos da árvore, enquanto o CO1 poderia estruturar os nós mais recentes. Além disso, como o foco do trabalho não são as relações intragenéricas, optou-se por concentrar esforços e recursos nas espécies que poderiam resolver os relacionamentos intergenéricos.

Esse tipo de estratégia traz como consequência uma matriz com muitos dados ausentes. Na literatura existe um embate a respeito dos efeitos dos dados ausentes na matriz sobre a inferência filogenética. De forma geral, acredita-se que os dados ausentes possam diminuir chance de recuperar a hipótese filogenética correta (para uma revisão sobre o tema vide Wiens & Moen 2008). Há evidências, no entanto, de que tais efeitos estejam ligados à proporção de dados ausentes, e não ao número absoluto deles. Em uma simulação com uma matriz de 2000 caracteres, constatou-se que a árvore verdadeira pode ser encontrada mesmo quando metade dos táxons tenham 90% de dados ausentes (Wiens 2006). Outro estudo, no entanto, constatou que é importante a distribuição dos dados ausentes, pois a distribuição não aleatória destes pode levar a recuperação da árvore incorreta (Simmons 2012). Então, como as informações presentes na literatura eram conflitantes, decidiu-se por fazer dois conjuntos de análises: um com a matriz completa, com as espécies das duas categorias, daqui para frente denominada ‘COMP’ e outra com as espécies da segunda categoria (reduzida a uma espécie por gênero), daqui para frente denominada ‘RED’, com uma proporção menor de dados ausentes.

2.2 Extração do DNA, amplificação e sequenciamento

A extração do DNA, amplificação e sequenciamento dos genes de interesse foi realizada no laboratório de Diptera da *North Carolina State University*, chefiado pelo professor doutor Brian M. Wiegmann.

O DNA foi extraído usando o conjunto DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, Estados Unidos) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante com as seguintes modificações: as moscas inteiras ou pernas foram individualmente colocadas em lenços de papel para a evaporação do álcool no qual se encontravam preservadas, e incubadas em proteinase K e buffer por duas noites; a diluição final foi realizada com 60µl de tampão, a fim de obter DNA genômico mais concentrado.

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas usando iniciadores anteriormente publicados ou desenhados para este estudo (Tabela 2). Todos os iniciadores foram utilizados na concentração de 10nmol/µl. As reações foram conduzidas usando TaKaRa Ex Taq (Takara Bio, Shiga, Japão) seguindo as especificações do fabricante, sendo que para o CO1 foi utilizado 1µl de iniciador e 0,8µl de DNA, e para os genes nucleares 2µl de iniciador, 1µl de DNA e 2µl de MgCl₂, para um volume total de 49µl. A PCR para o CO1 foi efetuada com os

seguintes ciclos: iniciação a 95°C por 5', desnaturação a 93°C por 20'', anelamento a 50°C por 40'', extensão a 72°C por 2'. O ciclo de desnaturação, anelamento e extensão foi repetido 33 vezes, seguido por um período final de extensão a 72°C por 5'. Para os genes nucleares, foi utilizada PCR *touchdown*, a qual tem o objetivo de minimizar a amplificação de produtos espúrios através da diminuição sucessiva da temperatura de anelamento (Don *et al.* 1991). Os ciclos utilizados foram: iniciação a 94°C por 4', desnaturação a 94°C por 30'', anelamento a 51°C por 30'', extensão a 72°C por 2'. O ciclo de desnaturação, anelamento e extensão foi repetido 4 vezes, seguido por 6 ciclos nas mesmas condições mas com anelamento a 47°C por 1', posteriormente 36 ciclos com anelamento a 42°C por 20'' e extensão a 72°C por 2'30'' e um período final de extensão a 72°C por 3'. Os produtos das PCRs dos genes EF1 α e CAD tiveram em muitos casos que ser reamplificados. Nessas ocasiões, os ciclos foram levemente modificados, sendo a extensão do primeiro ciclo mantida por 1'20'' e o segundo ciclo com anelamento a 45°C por 30'' e extensão a 72°C por 1'20'' repetido 36 vezes. A maior parte das sequências de CAD foram obtidas através de uma amplificação inicial dos fragmentos 3 e 4, seguida de uma reamplificação do fragmento 4.

Os produtos da PCR passaram por processo de eletroforese em gel de baixo ponto de fusão para separação de possíveis amplificações indesejadas. Os produtos foram corados com solução de brometo de etídio e as bandas de interesse cortadas e purificadas usando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, Estados Unidos). Para cada amostra, 1 μ l do DNA purificado juntamente com 4 μ l de corante passaram novamente por eletroforese, mas em gel de agarose comum. Os géis foram observados sob luz ultravioleta e o brilho das bandas usado como uma medida indireta da quantidade de DNA, permitindo adequar a concentração a ser utilizada na reação de sequenciamento. As pré-reações de sequenciamento foram feitas usando BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), e em seguida enviadas para o *North Carolina State University Genomic Sciences Laboratory* para sequenciamento em ambas as direções.

As sequências foram editadas usando o programa SEQUENCHER 4.9 (Gene Codes Corporation, 2009). Para cada sequência, observou-se a concordância entre o cromatograma e os nucleotídeos, bem como entre as duas fitas complementares. Todas as regiões amplificadas para cada um dos genes eram compostas exclusivamente por éxons. No total, foram adquiridas 197 sequências e outras 131 foram obtidas no GenBank.

2.3 Alinhamento, escolhas dos modelos e outras análises

Para o alinhamento foram utilizadas as configurações padrão do programa MUSCLE (Edgar 2004), através da plataforma MEGA 6.05 (Tamura *et al.* 2013), que também foi utilizada para a visualização e edição dos mesmos. Após o alinhamento pelo programa, foi feita uma inspeção visual através da tradução para aminoácidos. Os alinhamentos de cada um dos genes foram concatenados com o programa SequenceMatrix v. 1.7.8 (Vaidya *et al.* 2010).

Para tentar identificar regiões dos alinhamentos com áreas pouco confiáveis, as quais podem levar a uma diminuição do sinal filogenético (Tavalera & Castresana 2007), utilizou-se o programa GBlocks (Castresana 2000). Ele foi criado no intuito de extrair regiões onde o alinhamento é problemático, pela seleção de blocos conservados. As regiões descartadas caracterizam-se por blocos contínuos com alto grau de heterogeneidade ou abundância de *gaps*. As regiões contíguas aos blocos homogêneos também precisam ser altamente conservadas para serem mantidas (Castresana 2000). O programa oferece opções para tornar a análise mais ou menos rigorosa. As opções que a tornam menos rigorosa, e que, portanto, retiram menos sítios do alinhamento final, são: permitir blocos finais menores, que relaxa, nas pontas do alinhamento, o número mínimo de sítios conservados contíguos para um bloco ser mantido; permitir *gaps* nos blocos finais, que possibilita sequências de comprimentos diferentes, quando há uma ou mais sequências muito mais curtas do que as demais; e, permitir o relaxamento dos parâmetros de corte das posições adjacentes aos blocos conservados. Foram testados três conjuntos de parâmetros: todas as opções para uma análise menos restritiva; apenas as duas primeiras opções; nenhuma das opções. O programa foi utilizado através de seu servidor online (Castresana 2000, Tavalera & Castresana 2007).

Além das regiões hipervariáveis, outra característica dos dados que pode trazer efeitos deletérios sobre a inferência filogenética é a saturação das substituições, que é a presença de múltiplas substituições nos mesmos sítios, levando a perda do sinal filogenético (Xia *et al.* 2003). Para testar se os dados apresentam saturação, o programa DAMBE 5.3.74 (Xia 2013) foi utilizado para gerar gráficos com o número observado de transições e transversões versus a distância genética corrigida pelo modelo escolhido pelo JModelTest (Darriba *et al.* 2012) (vide abaixo). É esperado que o número de transições e transversões aumente com o tempo, mas que o

número de transições seja maior que o número de transversões. Quando tal premissa é violada há evidência de saturação (Simon *et al.* 1994). Para cada gene foram feitos três gráficos: para as primeiras e segundas posições dos códons, para as terceiras e todas em conjunto. Como os sítios sem informação causam ruído nesta análise, o alinhamento teve as pontas cortadas e sequências muito curtas foram retiradas.

Tanto para a análise pelo critério de máxima verossimilhança (MV) quanto pelas probabilidades posteriores bayesianas (PPB) é necessário utilizar modelos de substituição dos nucleotídeos, os quais descrevem taxas de substituição entre as bases nitrogenadas e suas frequências relativas. A escolha dos modelos é crítica, pois tanto a subparametrização quanto a hiperparametrização interferem na inferência filogenética. A escolha de modelos que subestimam as taxas de substituição pode levar à atração de ramos longos (Felsenstein 1978). Especificamente na inferência pelo método bayesiano, há evidências de que a hiperparametrização é menos problemática do que a escolha de modelos muito simples, especialmente quando estes deixam de levar em conta a variação da taxa de evolução entre os sítios (Huelsenbeck & Rannala 2004). No entanto, a hiperparametrização pode aumentar o erro aleatório e diminuir a precisão da análise. Para escolher o modelo que mais adequadamente explica os dados, existem testes estatísticos, sendo alguns dos mais comuns o critério de informação de Akaike (AIC) e sua versão corrigida (AICc), e o critério de informação bayesiano (BIC). O critério de Akaike corrigido é recomendado para matrizes pequenas (Sullivan & Joyce 2005), e por isso não foi utilizado. Os dois testes foram aplicados conforme implementados no programa JModelTest 2.1.4 (Darriba *et al.* 2012). No caso dos critérios divergirem na escolha, utilizou-se o teste de razão de verossimilhança para indicar o modelo mais apropriado.

Considerando que os alinhamentos possuem regiões heterogêneas, é interessante testar diferentes partições, para separar conjuntos de sítios que possam ter evoluído de formas distintas. É plausível esperar que diferentes genes sejam heterogêneos sob este aspecto. Assim também, as posições dos códons podem ter taxas de evolução diferentes, especialmente as das primeiras e segundas posições em relação as terceiras. Por isso, é preciso decidir como lidar com a diversidade de processos de substituição, tanto na escolha dos modelos quanto no particionamento (Sullivan & Joyce 2005). Assim como na eleição dos modelos, é preciso fazer um balanço, pois o super-particionamento dos dados pode levar a um aumento significativo da demanda computacional da análise (ao menos para a inferência pela máxima verossimilhança), e

a potencialização de erros aleatórios na estimativa dos parâmetros de cada partição (causados pela diminuição na quantidade de dados disponíveis) (Bradley *et al.* 2005). Com base nisto e nos resultados do teste de saturação, optou-se por comparar quatro formas de divisão do alinhamento, onde todos os genes foram utilizados com todas as posições dos códons, exceto o CO1, onde indicado: todos os genes juntos (=sem particionamento), daqui por diante referida como ‘SP’; por gene (=quatro partições), daqui por diante referida como ‘GENE’; por gene com o CO1 sem as terceiras posições (=quatro partições), daqui por diante referida como ‘CO1s3’; por gene e também com primeiras e segundas posições separadas das terceiras (=oito partições), daqui por diante referido como ‘GENE123’.

2.4 Análises filogenéticas

Existem atualmente três critérios principais para a escolha das hipóteses filogenéticas ótimas: parcimônia (Pa), máxima verossimilhança (MV) e probabilidade posterior bayesiana (PPB). Não existe na literatura consenso sobre qual critério recupera hipóteses filogenéticas mais robustas, embora existam evidências de que a parcimônia seja mais suscetível a problemas como atração de ramos longos (Felsenstein 1978) e dados faltantes (*e.g.* Dunn *et al.* 2003). Não há, no entanto, nenhuma garantia de que algum método possa ser melhor sob todas as circunstâncias, ou para todos os conjuntos de dados (Lewis 1998). Assim sendo, os três critérios foram utilizados, em uma espécie de análise de sensibilidade (Wheeler 2001), porém, ao invés da congruência topológica, utilizada na proposta original dessa análise, foi utilizada a congruência de suporte.

Para a inferência de hipóteses filogenéticas pela PPB, o programa MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012) foi utilizado através do portal Cipres (Miller *et al.* 2010) com o algoritmo MCMCMC (*Metropolis coupled Markov Chain Monte Carlo*). Para cada análise foram feitas 2 corridas simultâneas, com 8 cadeias cada por 10^8 de gerações com um topologia salva a cada 1000 gerações, utilizando as configurações padrão do programa. É praticamente impossível explorar a totalidade do espaço amostral, e por isso é interessante fazer mais de uma corrida independente, partindo de pontos aleatórios e distintos do espaço. A convergência entre amostras (corridas), é um sinal de que o espaço amostral foi satisfatoriamente explorado. A convergência foi inferida pela comparação do desvio padrão médio e máximo da probabilidade dos clados (*split frequencies*), que é um indicativo do grau de similaridade entre as topologias filogenéticas

obtidas pelas diferentes corridas. Também foi verificado se o espaço dos parâmetros foi corretamente explorado (*mixing*) pela análise dos gráficos de traço de trajetória (*trace plots*) visualizados no programa Tracer 1.6 (Rambaut *et al.* 2013).

Para verificar se alguma das hipóteses gerada por diferentes esquemas de particionamento era estatisticamente superior as outras, foi feita uma análise sobre a estimativa da verossimilhança marginal. Ela pode ser estimada por diferentes métodos, como média harmônica (Newton & Raftery 1994) e amostragem por “*stepping-stone*” (Xie *et al.* 2011). Embora a média harmônica seja o método mais comumente utilizado, ela possui a tendência de superestimar a verossimilhança marginal (Xie *et al.* 2011, Fan *et al.* 2011). O procedimento de amostragem por “*stepping-stone*” foi feito com 1000000 de gerações com amostragem a cada 1000. Os valores de verossimilhança marginal resultantes das duas análises foram comparadas pelo cálculo dos fatores de Bayes (*Bayes factors*), que é simplesmente a divisão do valor de verossimilhança marginal de uma partição (P_1) pelo valor de uma partição alternativa (P_0) (Nylander *et al.* 2004). O valor resultante pode ser interpretado de acordo com uma tabela, onde fatores de Bayes maiores do que 20 indicam evidência forte e maiores do que 150 evidência muito forte contra P_0 (Kass & Raftery 1995).

Para a análise de máxima verossimilhança utilizou-se o programa Garli 2.0 (Zwickl 2006), com 50 buscas independentes nas opções padrão, exceto pelo valor de melhora da verossimilhança nas últimas 20000 gerações necessário para encerrar a busca corrente (*scorethreshforterm* = 0,01), e pelo controle de quais árvores terão os comprimentos de ramos extensivamente otimizados (*treerejectionthreshold* = 100,0). Para recobrar uma noção de convergência também para a máxima verossimilhança, tentou obter-se a mesma topologia filogenética em pelo menos duas análises distintas. Assim, cada análise foi rodada no mínimo duas vezes, e no máximo quatro. Quando a convergência não foi alcançada, utilizou-se a árvore com maior valor de verossimilhança. Como medida de suporte dos nós utilizou-se o *bootstrap* não paramétrico (Felsenstein 1985). As buscas foram feitas com 1000 pseudo-réplicas sob as condições padrão do servidor *on-line* do Garli (Bazinnet & Cummings 2011). O processamento das pseudo-réplicas e mapeamento dos valores de *bootstrap* na melhor árvore foi feita com o programa DendroPy 3.12 (Sukumaran & Holder 2010).

A análise de parcimônia foi conduzida pelo programa TNT 1.1 (Goloboff *et al.* 2008), com *new technology search* com os seguintes algoritmos: *sectorial search* (Goloboff 1999), *ratchet* (Nixon 1999) e *tree drifting* (Goloboff 1999), todos com as configurações padrão e *tree fusing* (Goloboff 1999) com 100 rodadas. A combinação destes algoritmos permite ao programa sair de possíveis ilhas de topologias filogenéticas subótimas. A análise de *bootstrap* com 1000 replicações foi feita sob as mesmas condições, a exceção do *tree fusing*, que foi utilizado sem modificação das configurações padrão. Para o cálculo dos valores de *bootstrap* das matrizes completas, não foi utilizado o algoritmo *sectorial search*, já que este causava um erro na análise. Os resultados foram mapeados sobre o consenso estrito das árvores mais parcimoniosas com o programa DendroPy. Os *gaps* foram interpretados como dados faltantes. Os esquemas de partição não são aplicáveis à Pa, por isso as foram conduzidas análises apenas com todas as posições dos códons e sem as terceiras posições do CO1.

Todas as árvores foram enraizadas entre *Fannia canicularis* e os demais táxons terminais, e graficamente manipuladas usando o programa FigTree 1.4 (Rambaudt & Drummond 2012).

2.5 Estimativa dos tempos de divergência

Os tempos de divergência entre as linhagens de Muscidae foram calculados através do programa BEAST 1.7.5 (Drummond *et al.* 2012) através do portal Cipres. O arquivo com os dados e comandos foi criado através da interface gráfica BEAUTi 1.7.5 (Drummond *et al.* 2012). Da mesma maneira que na inferência da hipótese filogenética pelo método bayesiano, verificou-se se o espaço dos parâmetros foi corretamente explorado através da análise dos traços de trajetória. Como os genes podem ter taxas de evolução distintas, e dentre as análises particionadas o esquema ‘GENE’ foi um dos que obteve melhores resultados com a PPB (vide Resultados e Discussão), optou-se por fazer as análises com o BEAST utilizando-se este esquema de particionamento. Os modelos de substituição das partições foram considerados individualmente (*unlinked*), assim como o modelo do relógio molecular relaxado, enquanto a árvore foi considerada única para o conjunto de partições (*linked*). Para todas as partições foi utilizado o modelo GTR+I+Γ. O modelo *a priori* para a distribuição das árvores e dos comprimentos de ramos escolhido foi o *birth-death incomplete sampling* (Stadler 2009), e a árvore inicial foi aleatória. Este modelo, que conta com taxas constantes de especiação e

extinção, considera que a amostragem do grupo não é completa (Stadler 2009). Foi utilizado um modelo de relógio molecular relaxado para acomodar a heterogeneidade entre as linhagens, mais especificamente, o modelo escolhido foi o *uncorrelated log-normal*, que de forma geral tem performance superior em relação a versão exponencial do mesmo modelo (Drummond *et al.* 2006). Foram utilizados três pontos de calibração com distribuição log-normal *a priori* para acomodar as idades estimadas dos fósseis conhecidos para o grupo sob estudo: 1) *Protoanthomyia minuta* Michelsen, 2000, designado para o clado dos Anthomyiidae, encontrado no depósito de âmbar báltico com idade estimada 42 MA (Michelsen 2000); 2) *Archaeopolietes tertiaria* Pont & Carvalho, 1996, do âmbar dominicano, que tem idade estimada entre 15-20 MA (Pont & Carvalho 1996, Iturralde-Vinent & MacPhee 1996); 3) *Phaonia electrica* Pont & Carvalho, 1996, com as mesmas características do último. As seguintes configurações foram utilizadas: para os Anthomyiidae, média de log 2,565, desvio padrão de log 0,357 e *offset* de 42, equivalente a uma média e 55 MA e 95% da densidade *a priori* até 65,01 MA; e para os dois Muscidae média e *offset* de 15 MA, desvio padrão de 0,421, resultando em uma mediana de 28,73 MA e 95% da densidade *a priori* em até 42,44 MA com a opção *mean in real space*. Um quarto ponto de calibração foi utilizado, para todo o grupo (equivalente ao parâmetro *treemodel.rootheight*), com distribuição normal *a priori* baseada na idade estimada para a divergência do clado de Fanniidae, Muscidae, Anthomyiidae e Oestroidea por Wiegmann *et al.* (2011). A média utilizada foi de 53 MA com desvio padrão de 5,3, resultando em 95% da densidade *a priori* até 58,76 MA. Cada análise foi rodada duas vezes, e os arquivos de árvores foram combinados e processados no DendroPy, com as primeiras 25000 árvores descartadas. As árvores finais foram visualizadas no programa FigTree.

3. Resultados

3.1 Análises preliminares

As análises com os três esquemas do GBlocks resultaram em alinhamentos concatenados com comprimento de 2472, 2141 e 1284 pares de bases, do menos restritivo para o mais

restritivo. Como os alinhamentos deste trabalho são bastante conservados, o programa limitou-se a cortar as pontas, que tornam-se alvos pela sua concentração de dados ausentes. Análises experimentais demonstraram que a resolução das topologias filogenéticas piorou conforme menos dados foram disponibilizados, tendência também encontrada em estudos de simulação, ao menos para a máxima verossimilhança (Castresana 2000, Tavalera & Castresana 2007). Por isso, optou-se por fazer as análises finais com o alinhamento resultante do conjunto de opção menos restritivas do Gblocks, com 2472 sítios. Destes, 465 são do AATS (92% do comprimento original), 730 do CAD (83% do original), 620 do EF1 α (86% do original) e 656 do CO1 (78% do original). A matriz contém 148 espécies, 2472 caracteres e uma proporção de 48% de dados ausentes. A matriz reduzida contém 67 espécies, 2472 caracteres e 27% de dados ausentes.

Os gráficos de saturação não conseguiram demonstrar claramente se há ou não saturação, a exceção do EF1 α , que não apresenta saturação, já que transversões e transições aumentaram linearmente em relação a distância genética, e com um número maior de transições, indicando ausência de saturação (Salemi 2009). Por isso, optou-se por fazer análises experimentais sem as terceiras posições dos genes, as quais resultaram em topologias filogenéticas com resolução muito baixa, e por isto foram descartadas do trabalho. Foi mantida apenas a análise sem as terceiras posições do CO1, já que este revelou uma quantidade superior de transversões, uma das características de genes saturados.

A busca pelos melhores modelos de substituição para cada bloco de dados resultou em grande parte no modelo GTR+I+ Γ , que possui o maior número de parâmetros entre os modelos analisados (Tabela 4), mesmo com a punição sobre a adição de parâmetros utilizada tanto pelo AIC quanto pelo BIC. Quando o teste de razão de verossimilhança foi utilizado para escolher entre modelos apontados por diferentes abordagens, o modelo com menos parâmetros foi sempre preferido. A fórmula do teste $[2(\ln L_I - \ln L_0)]$ envolve o valor de verossimilhança dos modelos sob escrutínio, e a aceitação da hipótese alternativa ocorre, neste caso (onde as hipóteses são aninhadas), quando o resultado converge com a distribuição do X^2 . Ou seja, a aceitação da hipótese alternativa depende tanto dos valores de verossimilhança quanto dos graus de liberdade, e como os valores de verossimilhança resultaram parecidos, aqueles modelos com menos parâmetros foram preferidos.

3.2 Inferência filogenética e estimativa dos tempos de divergência

Estão resumidas, na Tabela 3, as análises realizadas, os seus resultados, e quais convergiram no sentido utilizado neste trabalho, e quais falharam sob esse aspecto.

Com o critério das probabilidades posteriores bayesianas, todas as análises foram bem sucedidas em explorar o espaço amostral dos parâmetros, conforme a inspeção visual dos traços de trajetória (dados não apresentados), com exceção da análise do esquema de particionamento ‘GENE123_COMP’. Adicionalmente, mesmo após 10^8 gerações com este conjunto de dados, o desvio padrão das *split frequencies* não chegou ao valor inferior a 0,01, que indica a convergência das corridas. O mesmo ocorreu com o ‘CO1s3_RED’ (Tabela 5).

Os valores da verossimilhança marginal estimados pelo método de médias harmônicas (Tabela 6), quando comparados pelos fatores de Bayes indicaram como melhor esquema de particionamento o ‘CO1s3’ (Tabela 7). No entanto, é dúbio que o valor deste possa ser diretamente comparável aos demais. Dentre os esquemas de particionamento com todas as posições dos códons, ‘GENE123_RED’ e ‘GENE_COMP’ foram os indicados pelo teste. A estimativa por comparação de verossimilhanças marginais calculadas segundo o procedimento de “*stepping-stone*” (Tabela 8), gerou resultados semelhantes, indicando o esquema de particionamento ‘CO1s3’ como o que melhor explica os dados, e dentre os conjuntos com todas as posições, ‘GENE123’, tanto para os dados reduzidos quanto os completos (Tabela 9). Em se tratando das hipóteses filogenéticas com dados reduzidos, apenas a análise de ‘GENE’ recuperou a monofilia de Muscidae. Já nas hipóteses filogenéticas com os dados completos, apenas a análise de ‘SP’ recuperou Muscidae como monofilética. As hipóteses filogenéticas resultantes encontram-se nas Figuras 2-9.

As análises pela máxima verossimilhança com os conjuntos de dados reduzido convergiram já na segunda análise, exceto pelo esquema de particionamento ‘GENE’, que convergiu na terceira. Já com o conjunto total a análise de ‘SP’ convergiu na segunda tentativa, e os outros esquemas de particionamento falharam em convergir, no sentido utilizado neste trabalho. A análise de ‘CO1s3’ foi a que obteve o maior valor de verossimilhança dentre as quatro análises, seguida por ‘GENE’. Porém, as diferenças são bastante pequenas e não foram estatisticamente testadas. Nenhuma análise recuperou Muscidae como monofilética. As hipóteses filogenéticas resultantes encontram-se nas Figuras 10-17.

As duas hipóteses filogenéticas com dados reduzidos produzidas pelo critério da parcimônia recuperaram Muscidae como monofilética, em contraste com as com os dados completos. A análise de ‘SP’ resultou em 13 árvores igualmente parcimoniosas com 8866 passos, enquanto ‘CO1s3’ resultou em 8 árvores, com 7054 passos. Com os dados completos, a análise de ‘SP’ resultou em 11 árvores com 12353 passos, e a ‘CO1s3’ em 28 árvores com 8822 passos. Os consensos estritos de cada análise e os valores de *bootstrap* encontram-se nas figuras 18-21.

Na análise de tempos de divergência, os dois conjuntos de dados apresentaram bom *mixing*, conforme inspeção visual no Tracer. No entanto, os parâmetros *prior* e *posterior* apresentaram baixo valor amostral efetivo na análise com dados reduzidos. Os resultados da análise reduzida e completa, com as estimativas de tempo dadas pelo intervalo de confiança de 95% estão nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

4. Discussão

4.1 Inferência filogenética

Pelo tamanho da matriz era esperado que os dados faltantes não causassem efeitos deletérios na inferência filogenética pelo método bayesiano (Wiens & Morril 2011), e que a parcimônia fosse mais afetada (*e.g.* Dunn *et al.* 2003). No entanto, comparando a performance das análises com o conjunto de dados reduzido e completo, percebe-se que as hipóteses filogenéticas recuperadas no último caso tinham resolução e suporte consideravelmente menor. Notou-se também nestas análises, que os valores do desvio padrão das *split frequencies* máximas ficaram acima de 0,01, indicando que alguns relacionamentos continuavam ambíguos, mesmo após as 10⁸ gerações. Ainda, a maioria das análises de MV com dados completos não chegou a convergência, em oposição ao ocorrido com os dados reduzidos. Para se ter uma noção do grau de resolução nas análises reduzidas e completas, dividiu-se o número de nós com bom suporte (aqui considerado como probabilidade posterior $\geq 95\%$ e *bootstrap* $\geq 70\%$) pelo número de terminais, e percebeu-se que todos os critérios tiveram diminuição da resolução e do suporte, mas a MV em menor grau. É possível que as análises pelo método bayesiano com dados

completos convergissem caso fossem rodadas por mais gerações, o que seria computacionalmente muito custoso. A análise do esquema de particionamento ‘CO1s3_COMP’, por exemplo, caso mantivesse a tendência das últimas 50 milhões de gerações, demoraria mais 170 milhões de gerações para convergir. Assim, como o interesse principal deste trabalho são as relações entre as principais linhagens, e não as intragenéticas, as hipóteses filogenéticas com o conjunto de dados reduzidos serão as utilizadas para discutir as relações entre os Muscidae, e as completas apenas para fazer inferências a respeito de alguns gêneros.

A comparação da verossimilhança marginal pelos fatores de Bayes preferiu sempre esquema de particionamento ‘CO1s3’. No entanto, é provável que este número não seja comparável aos dos demais esquemas. Se considerarmos apenas os conjuntos de dados com todas as posições dos códons, o esquema de particionamento preferido foi sempre o com mais parâmetros, ‘GENE123’, a exceção do teste pelas médias harmônicas para os conjuntos de dados completos, o qual preferiu ‘GENE’. Os valores recuperados pelas médias harmônicas são considerados menos confiáveis do que aqueles obtidos pelo procedimento de “*stepping-stone*”, já que têm a tendência de superestimar a verossimilhança marginal e escolher modelos mais complexos (Xie *et al.* 2011). No presente estudo, os valores encontrados pela média harmônica são realmente maiores do que os calculados pela amostragem “*stepping-stone*” (Tabelas 6 e 8), e no entanto, como visto acima, isto não se refletiu na escolha do modelo mais complexo em todos os casos. É interessante notar que o esquema de particionamento ‘GENE123’, preferido pelos fatores de Bayes na maioria das vezes não recuperou Muscidae como um grupo monofilético, e também não chegou ao desvio padrão das *split frequencies* abaixo de 0.01. No caso das análises feitas pelo Garli, comparando-se os valores de verossimilhança, observou-se que aquela com maior valor foi novamente o esquema de particionamento ‘CO1s3’, seguida de ‘GENE’.

As análises que recuperaram a monofilia de Muscidae foram ‘SP_COMP’ pela PPB, ‘SP_RED’ pela Pa, ‘GENE_RED’ pela PPB, ‘CO1n3_RED’ pela PPB e Pa e ‘CO1n3_COMP’ pela Pa. Diversas análises obtiveram hipóteses filogenéticas nas quais a monofilia de Muscidae não foi recuperada pela presença de um ou dois terminais entre a raiz (*Fannia canicularis*) e os Anthomyiidae, na maioria dos casos *Reinwardtia* sp. nov. (‘SP_COMP’ pela MV, ‘SP_RED’ pela PPB e MV, ‘GENE123_RED’ pela PPB); mas também *Cyrtoneurina geminata* (‘SP_COMP’ pela Pa); *Reinwardtia* sp. nov. e *Cyrtoneurina geminata* (‘GENE123_COMP’ pela MV); ou ainda *Reinwardtia* sp. nov. e *Potamia littoralis* (‘GENE_RED’ pela MV). As demais

hipóteses filogenéticas recuperaram Anthomyiidae como um clado inserido na linhagem de Muscidae. No entanto, todo o conhecimento sistemático e taxonômico corrente leva a crer que o posicionamento dos gêneros de Anthomyiidae utilizados nesta análise dentro de Muscidae trata-se de um artefato, já que a monofilia desta família é amplamente reconhecida, sendo sustentada por estudos morfológicos e moleculares.

Considerando os sinais conflitantes entre diferentes fontes de evidência, tanto dentre os testes estatísticos quanto entre estes e o conhecimento sistemático, optou-se por não escolher uma hipótese filogenética como sendo a melhor, mas sim utilizar a congruência dos suportes da análise de sensibilidade para a discussão taxonômica. Foram utilizadas para fazer o mapeamento das informações encontradas nas análises as hipóteses filogenéticas que tivessem recuperado a monofilia de Muscidae, e que tivessem o maior número possível de clados resolvidos, para facilitar a discussão. Para o conjunto de dados reduzido, o esquema de particionamento ‘GENE’ cumpriu os requisitos, enquanto para o conjunto de dados completos, o esquema de particionamento ‘SP’, ambas recuperadas pela PPB. Nestas hipóteses filogenéticas foi mapeado o suporte de todas as outras análises, quando estas apresentavam probabilidade posterior $\geq 95\%$ e *bootstrap* $\geq 70\%$. Os dados de ‘CO1s3_RED’ e ‘123GENE_COMP’ analisados pela PPB não foram adicionados, já que não chegaram a convergência. Alguns clados com suporte superior ao mínimo eram diferentes em relação aqueles encontrados nas hipóteses filogenéticas escolhidas para o mapeamento. Nesses casos, foram feitas inserções mostrando os relacionamentos alternativos para esses clados (Figuras 24 e 25).

Ressalta-se o fato de que as topologias filogenéticas variaram quanto ao posicionamento de diversos terminais, principalmente aqueles que não ficaram subordinados a clados menores. Isto refletiu-se na resolução das árvores, que em casos como o ‘CO1s3_COMP’ (Fig. 9) pela PPB foi extremamente baixa. No entanto, todas as hipóteses filogenéticas com os dados completos resgataram os três clados principais (conforme Fig. 24), ou subunidades deles, no caso das topologias filogenéticas de baixa resolução. Ainda, todas as análises apontaram um relacionamento mais próximo entre o Clado 2 e 3 em relação ao 1, exceto ‘CO1s3_COMP’, que não possui resolução nos relacionamentos entre os clados principais. No caso das hipóteses filogenéticas com dados reduzidos, a análise de ‘SP’ pela PPB resgatou o Clado 1 na mesma linhagem do Clado 3, mas sem bom suporte. Todas as outras análises foram congruentes em recuperar os três clados principais e seus relacionamentos da mesma forma que a análise com a

matriz completa (Tabela 3). As análises pela parcimônia com a matriz reduzida resgataram o Clado 2 como um agrupamento parafilético em relação ao Clado 3.

4.2 Discussão taxonômica e classificação

Atherigoninae foi a única subfamília de Muscidae que teve a sua monofilia recuperada, de acordo com a composição de gêneros dos catálogos utilizados como referência. No entanto, como apenas duas espécies foram utilizadas e seu agrupamento não obteve bom suporte, este resultado precisa ser visto com cautela. Quanto às tribos, Stomoxyini e Coenosiini foram recuperadas como monofiléticas, e obtiveram bom suporte nas três análises por inferência bayesiana. Limnophorini também teve sua monofilia recuperada, com bom suporte em quatro análises, duas por inferência bayesiana, uma por máxima verossimilhança e outra por parcimônia (Fig. 24). Da mesma forma, Dichaetomyiini obteve bom suporte de todas as análises realizadas (Fig. 25c), mas com apenas duas espécies na amostragem, conclusões mais gerais precisam ser criteriosas.

Apesar desses resultados à primeira vista pouco congruentes com o conhecimento atual da sistemática de Muscidae, é possível reconhecer grupos monofiléticos mais abrangentes, bem como relacionamentos propostos por diversos pesquisadores, conforme discussão abaixo. A Tabela 10 resume a classificação proposta a partir dos resultados encontrados neste trabalho e a compara com a atual. As diferenças entre as hipóteses de relacionamento entre os principais grupos de Muscidae de acordo com Hennig (1965), Carvalho (1989) e o encontrado neste trabalho estão representadas na Figura 26.

Para cada clado discutido, faz-se uma breve discussão a respeito de quais gêneros foram recuperados como monofiléticos e quais não foram. É preciso deixar claro que o objetivo do trabalho não foi testar a monofilia dos gêneros, e nem a amostragem era adequada para tanto. No entanto, os resultados aqui encontrados são relevantes, por ser a primeira vez em que mais de um representante de determinados gêneros são inclusos em uma filogenia. Em outros casos, foi utilizada aqui a maior amostragem com dados moleculares para o gênero. Assim, os resultados, ainda que inconclusivos a respeito da monofilia dos gêneros, podem apontar caminhos para novos trabalhos.

O Clado 1 (Fig. 24) é composto por gêneros tradicionalmente alocados em Achanthipterinae, Azeliini e Reinwardtiini (Azeliinae), e Muscini e Stomoxyini (Muscinae). Destes, apenas Stomoxyini, na composição dos catálogos atuais, teve sua monofilia recuperada, sendo congruente com estudos anteriores (Carvalho 1989, Kutty *et al.* 2008). Embora o Clado 1 encontre suporte apenas nas análises dos esquema de particionamento ‘SP’ e ‘GENE’, ambos pela PPB, o estreito relacionamento entre Muscini, Stomoxyini e Azeliini (Azeliinae) já havia sido notado anteriormente por outras filogenias moleculares (Schuehli *et al.* 2007, Kutty *et al.* 2008, 2010). Filogenias morfológicas apontaram Muscini como um grupo monofilético (Hennig 1965, Carvalho 1989, Nihei & Carvalho 2007a), assim como Stomoxyini (Carvalho 1989) e Azeliini (Carvalho 1989, Savage & Wheeler 2004). Porém, características principalmente do ovipositor longo e a presença de cerda fronto-orbital proclinada e calcar favorecem a monofilia de um grupo formado por Azeliini e Muscinae (Hennig 1965). Conquanto essa afinidade não seja suportada por caracteres larvais, há similaridade entre as larvas de *Mesembrina* e *Polietes* (ambos Muscini) e Azeliinae (Skidmore 1985). Justamente estes dois gêneros, juntamente com *Polietina* (outro Muscini), foram aqueles que resultaram mais proximamente relacionados com os Azeliinae (Fig. 24). Considerando a composição aqui encontrada, o Clado 1, portanto, equivale a Muscinae, com um agrupamento mais amplo que aquele contido no seu conceito tradicional.

Achanthipterinae é tida como a linhagem irmã dos demais grupos de Muscidae (Hennig 1965, Carvalho 1989), e aqui *Achanthiptera rohrelliformis* foi recuperada como grupo irmão de *Micropotamia* sp. 1. Este relacionamento, embora tenha sido encontrado em diversas análises, não possui bom suporte. No entanto, Hennig (1965) aponta diversos caracteres comuns entre Achanthipterinae e Muscinae, a qual ele considera uma linhagem derivada imediatamente após a primeira. A morfologia larval de Achanthipterinae e Azeliinae é bastante similar, especialmente de *Potamia* (Skidmore 1985), o que pode indicar que *A. rohrelliformis* forme efetivamente um grupo natural com os Muscinae e Azeliini (Azeliinae).

O posicionamento de *Reinwardtia* sp. nov. é bastante problemático, conforme visto na sessão de resultados. Conquanto a sua posição dentre os Muscini (Muscinae) encontre algum apoio na literatura (Hennig 1965), o mais provável é que a posição encontrada no presente trabalho seja um mero artefato, e ela forme um agrupamento natural junto ao Clado 2, conforme estudos baseados em caracteres morfológicos (*e.g.* Soares 2008). No entanto, os resultados deste

trabalho não permitem tirar uma conclusão mais acurada por isso optou-se por classificar o gênero como Muscidae *incertae sedis*.

Pont (1986) considerou *Ophyra* como sinônimo júnior de *Hydrotaea*. No entanto, a filogenia obtida neste trabalho sustenta que *Ophyra* seja gênero irmão de *Azelia*, enquanto *Hydrotaea* encontra-se na base deste clado, mas sem bom suporte (Fig. 24). Com a amostragem completa, há suporte de duas análises para uma maior proximidade entre *Hydrotaea* e *Drymeia*, e mais uma vez *Ophyra* e *Azelia* posicionam-se como gêneros irmãos, na base de Muscinae (Fig. 25a). Assim, os resultados deste trabalho suportam *Ophyra* como um gênero à parte de *Hydrotaea*.

Os seguintes gêneros inclusos no Clado 1 foram recuperados como monofiléticos (Fig. 25a): *Drymeia*, *Hydrotaea*, *Mesembrina*, *Polietes*, *Polietina*, *Musca* e *Morellia*. Destes, apenas *Polietes* e *Morellia* não têm sua monofila recuperada por hipóteses filogenéticas utilizando dados morfológicos (Savage & Wheeler 2004, Nihei & Carvalho 2007a). Na sua filogenia de Muscini, Nihei & Carvalho (2007a) separam um grupo de espécies, composto por *M. nigricosta* e *M. xanthoptera*, que não foi recuperado junto ao restante das espécies do gênero. O mesmo não ocorreu nos resultados do presente estudo, já que as espécies supra citadas foram encontradas como espécies irmãs, mas juntamente aos demais representantes de *Morellia* utilizados no estudo, todos eles pertencentes a *Morellia sensu strictu*, de acordo com a delimitação proposta por Nihei & Carvalho (2007a). A monofilia de *Thricops* não foi recuperada, pela presença de *Huckettomyia watanabei* dentro do gênero. *Dasyphora* foi recuperado como um agrupamento parafilético em relação a *Sarcopromusca*, e *Neomyia* como polifilético. O relacionamento entre os gêneros *Mesembrina*, *Polietes* e *Polietina* foi recobrado de duas formas diferentes, e na literatura há mais suporte para que *Polietes* seja mais próximo de *Mesembrina* do que de *Polietina* (Skidmore 1985, Nihei & Carvalho 2007a) (Fig. 25a, Quadro 1).

O Clado 2 (Fig. 24) é composto por gêneros alocados nas subfamílias Atherigoninae, Cyrtoneurinae, Mydaeinae e na tribo Reinwardtiini (Azeliinae). Embora esta linhagem tenha suporte apenas da análise com o esquema de particionamento ‘GENE’ pela PPB, a afinidade entre gêneros de Reinwardtiini e Cyrtoneurinae já havia sido apontada por outras filogenias moleculares (Schuehli *et al.* 2007, Soares 2008) e investigações morfológicas (Skidmore 1985). Como *Reinwardtia*, embora sem bom suporte, está alocada em Muscinae (Clado 1), o Clado 2

será denominado Cyrtoneurinae, mesmo com todos os outros gêneros alocados em Reinwardtiini utilizados nesta análise encontrando-se no Clado 2. Atualmente é consenso que Cyrtoneurinae, a qual foi constituída por Snyder (1954) e Pont (1972) para agrupar as linhagens neotropicais com cerdas no anepímero e sem calcar, não constitui uma subfamília monofilética (Carvalho *et al.* 1993). Baseado em caracteres larvais, Skidmore (1985) agrupou os Cyrtoneurinae, Reinwardtiini e gêneros paleotropicals cujas larvas se desenvolvem em moluscos gastrópodes terrestres (*Ochromusca*, *Aethiopomyia* e *Alluaudinela*), todos alocados em Dichaetomyiini. Por outro lado, com base em uma filogenia inferida por caracteres morfológicos de adultos e de biologia das larvas, Couri & Carvalho (2003) propuseram alocar os gêneros de Cyrtoneurinae em Dichaetomyiini, já que *Dichaetomyia*, *Cyrtoneurina*, *Cyrtoneuropsis* e os gêneros paleotropicals supracitados formaram um grupo monofilético com *Charadrella*, gênero neotropical de Cyrtoneurinae cujas larvas possuem o mesmo hábito malacófago. Esta hipótese foi recuperada por filogenias baseadas exclusivamente em caracteres de adultos, as quais incluíram *Cariocamyia* na mesma linhagem (Soares 2008, Haseyama & Carvalho 2012a). Foi observado que *Cariocamyia maculata* Snyder, 1951, uma das duas espécies do gênero, utiliza gastrópodes terrestres como sítio de criação de imaturos (d'Almeida 1994). É interessante notar que em diversas análises *Cariocamyia* e *Prohardyia* encontram-se no equivalente ao Clado 2, associados a *Cyrtoneuropsis* (Figs. 18, 6, 7, 14-16, 20 e 21). *Prohardyia*, que foi utilizado aqui pela primeira vez em uma análise filogenética, é tradicionalmente agrupado com outros gêneros com carena facial que ocorrem na região australiana, ora junto com os Dichaetomyiini (Hennig 1965) ora com os Phaoniinae (Pont 1966). Embora a posição do gênero tenha variado nas análises, é interessante que por vezes ele tenha se agrupado com *Cyrtoneuropsis*, já que tanto este gênero quanto *Cyrtoneurina* também apresentam carena facial (Haseyama & Carvalho 2012b), naquele trabalho denominada tubérculo facial. Aliando esta evidência à suposição a respeito da biologia de *Cariocamyia*, supõe-se que a posição natural destes gêneros seja junto ao Clado 2. No entanto, devido as evidências conflitantes das diferentes hipóteses filogenéticas, optou-se por classificar tanto *Cariocamyia* quanto *Prohardyia* como *Muscidae incertae sedis*.

Quanto a Atherigoninae (representada aqui por duas espécies de *Atherigona*), a subfamília já foi considerada por Hennig (1965) como um grupo possivelmente relacionado a Phaoniinae, subfamília que incluía a maior parte dos gêneros atualmente classificados em

Reinwardtiini. Da mesma forma, a proximidade entre Atherigoninae e Reinwardtiini já havia sido apontada através de caracteres larvais (Skidmore 1985).

Alguns relacionamentos entre gêneros encontrados neste trabalho já haviam sido apontados anteriormente com base em caracteres morfológicos, como *Chaetagenia* e *Pseudoptilolepis* (Schuehli & Carvalho 2005, Soares 2008) e *Cyrtoneurina* e *Cyrtoneuropsis* (Pamplona 1999). *Scutellomusca*, que foi recuperado com o gênero irmão de *Cyrtoneurina* e *Cyrtoneuropsis* em todas as análises, está atualmente em Mydaeinae (Couri & Carvalho 1992). Conquanto a posição aqui encontrada possa parecer deslocada, o gênero já foi considerado como Cyrtoneurinae (Hennig 1965). *Hemichlora*, outro Mydaeinae (Carvalho *et al.* 2005) também foi recuperado dentre os Cyrtoneurinae.

Os seguintes gêneros de Cyrtoneurinae (Clado 2) foram recuperados como monofiléticos (Fig. 25): *Muscina*, *Atherigona*, e dependendo da análise, *Philornis* e *Pseudoptilolepis*. *Pseudoptilolepis* possui características que deixam poucas dúvidas a respeito de sua unidade natural (Schuehli & Carvalho 2005). A monofilia de *Philornis* também foi recuperada por estudos filogenéticos morfológicos (Couri & Carvalho 2003, Couri *et al.* 2007, Soares 2008), tornando a hipótese em que o Gênero Novo aparece na base do clado de *Philornis* mais plausível. Este gênero novo possui duas espécies, ambas coletadas em áreas de elevada altitude no Equador (Carvalho *et al.*, em preparação). *Neomuscina* pode ser considerado monofilético com a inclusão de *Cyrtoneurina costalis*. Espécies de *Cyrtoneurina* não só se agruparam com *Neomuscina*, mas também com *Cyrtoneuropsis*, em dois cladogramas distintos, e *Atherigona* em algumas análises, cenário pouco provável. *Cyrtoneuropsis* foi recuperado em três cladogramas distintos. Parece precipitado, no entanto, afirmar que *Cyrtoneurina* e *Cyrtoneuropsis* sejam polifiléticos. Quanto a *Cyrtoneurina*, a posição de *C. costalis* dentre *Neomuscina* e *C. alifusca* dentre *Cyrtoneuropsis* são bem suportadas, mas é preciso uma inspeção morfológica para afirmar se estas espécies podem ser realocadas ou se os gêneros precisam ser reavaliados. Já *C. geminata* mudou diversas vezes de posição nas análises, e sua posição é incerta. No que diz respeito a *Cyrtoneuropsis*, na maioria das análises foram observados três agrupamentos, dois no equivalente a Cyrtoneurinae e outro, com *C. conspersa*, *C. fuscicosta* e *C. gemina* na base de Muscidae. O posicionamento deste último grupo não possui suporte, e provavelmente ele pertence Cyrtoneurinae também. É interessante notar que todas as espécies de *Cyrtoneuropsis* utilizadas neste trabalho que possuem ovipositor encurtado e com espinhos fortes foram

agrupadas (*C. multomaculata*, *C. paraescita*, *C. neotrita*, *C. protosetosa*, *C. similata* e *C. nisae*), a espelho de filogenias morfológicas (Pamplona 1999, Haseyama & Carvalho 2012b). É possível, portanto, que este constitua um gênero a parte, mas não se pode descartar a possibilidade de que a separação destes grupos seja apenas um efeito da amostragem.

O Clado 3 é composto por gêneros alocados nas subfamílias Cyrtoneurinae, Phaoniinae, Mydaeinae e Coenosiinae (Fig. 24), e pela lei da prioridade será denominado Mydaeinae. Mais uma vez, embora as diferentes análises não suportem este relacionamento encontrado analisando o esquema de particionamento ‘GENE_RED’, o estreito relacionamento entre Phaoniinae, Mydaeinae e Coenosiinae já havia sido recuperado anteriormente com base em dados moleculares (Schuehli *et al.* 2007, Kutty *et al.* 2008, 2010). A proximidade entre estas subfamílias já havia também sido indicada também por análises filogenéticas morfológicas (Hennig 1965, Carvalho 1989). Conforme discutido anteriormente, é possível que *Cariocamyia* e *Prohardyia* sejam Cyrtoneurinae (Clado 2). *Dolichophaonia* em nenhuma análise entrou em algum clado subordinado, à exceção da análise do esquema de particionamento ‘SP_COMP’ pela parcimônia (Fig. 20), onde o gênero encontra-se em um agrupamento com *Hebecnema*, *Hemichlora* e *Psilochaeta*. *Dolichophaonia* foi descrito em Phaoniinae, e indicou-se que estaria proximamente relacionado a *Phaonia* (Carvalho 1993), e, posteriormente, Vockeroth (1996) sinonimizou os dois gêneros. Nenhuma das propostas é congruente com os resultados deste trabalho, já que em nenhuma análise os gêneros formaram um grupo monofilético. Apenas duas outras filogenias utilizaram espécies de *Dolichophaonia*, e nenhuma delas com amostragem representativa de outros Phaoniinae (Couri & Carvalho 2003, Soares 2008), dificultando uma análise mais aprofundada a respeito do posicionamento aqui encontrado para o gênero. Por esse motivo, optou-se por classificar *Dolichophaonia* como Mydaeinae *incertae sedis*.

Os Mydaeinae (Clado 3), podem ser subsequentemente divididos em unidades coesas. O Clado 3a é composto por gêneros de Mydaeinae, Phaoninae e Dichaetomyiini, e será denominado Mydaeini, já que *Mydaea* encontra-se nele. Assim como nas publicações de Kutty *et al.* (2008, 2010), membros das duas subfamílias encontraram-se combinados em uma única linhagem. Pela primeira vez uma espécie de Dichaetomyiini foi incluída em uma filogenia molecular, e os resultados favorecem a hipótese de que Dichaetomyiini é uma linhagem relacionada a Phaoniinae (Skidmore 1985), e não a Cyrtoneurinae. O posicionamento de *Hebecnema* em Mydaeini não possui bom suporte, mas a relação entre *Mydaea*, *Helina*, *Phaonia*

e *Dichaetomyia* tem bom suporte em todas as análises pela inferência bayesiana e em duas pela máxima verossimilhança.

O Clado 3b1 é composto por alguns Mydaeinae e pelos Limnophorini e é equivalente a Limnophorini, já que *Limnophora* se encontra nele. Skidmore (1985) já havia apontado que a diferenciação entre Mydaeinae e Limnophorini é arbitrária, e que *Graphomya* pertence aos Limnophorini. *Villeneuveia* foi recuperado entre os Coenosiini (Fig. 25), contrariando as hipóteses de posicionamento dentre os Limnophorini (Hennig 1965, Skidmore 1985, Kutty *et al.* 2008, 2010). A monofilia de Limnophorini (Clado 3b1) é apoiada pelo suporte de duas análises pela inferência bayesiana.

O Clado 3b2 é composto exclusivamente por gêneros de Coenosiini, uma linhagem cuja monofilia é bem estabelecida com base em caracteres morfológicos (Hennig 1965, Carvalho 1989, Couri & Pont 2000). O suporte para os Coenosiini vem de todas as análises pela inferência bayesiana. A presente análise, além de recuperar a monofilia da tribo, também é congruente com os dois grandes grupos separados por Hennig (1965) e posteriormente recuperados por uma filogenia morfológica (Couri & Pont 2000): o grupo *Lispocephala*, aqui composto por este gênero, *Pygophora* e *Orchisia*, e o grupo *Coenosia*, com os demais.

Os seguintes gêneros de Mydaeinae (Clado 3) foram recuperados como monofiléticos: *Myospila*, *Mydaea* e *Dichaetomyia*. As espécies de *Cordiluroides* e *Neodexiopsis* encontram-se em um clado sem resolução, por isso nenhuma inferência pode ser feita. Outros gêneros, como *Coenosia*, *Phaonia*, *Helina* e *Limnophora* são agrupamentos especiosos, amplamente distribuídos e longamente reconhecidos como unidades não naturais (*e.g.* Hennig 1965, Skidmore 1985, Couri & Carvalho 2002), à exceção do último, considerado monofilético por Hennig (1965).

4.3 Tempos de divergência

Nota-se que os tempos de divergência obtidos pela análise reduzida e completa não são idênticos. Embora sob um ponto de vista teórico fosse esperado que a inferência pelo método bayesiano diminuísse este efeito da amostragem sob as inferências (Heath *et al.* 2008), estudos empíricos constataram o contrário (Linder *et al.* 2005). Estudos anteriores também constataram

que idades mais antigas foram recuperadas quando comparadas análises com menos terminais (Yoder & Yang 2004, Linder *et al.* 2005). Assim, as inferências feitas a partir da amostragem completa serão a referência para a discussão que segue.

A idade de Muscidae foi estimada entre 50 a 60 MA (Fig. 27), correspondente a um período entre o Paleoceno superior e o Eoceno inferior, mais recente do que as estimativas baseadas na distribuição da família, entre o Cretáceo inferior e superior (Hennig 1965, Couri & Carvalho 2003). Vários recursos utilizados por diferentes linhagens já estavam disponíveis no Paleoceno superior, possibilitando o uso de diversos nichos e a radiação dos Muscidae. A maioria dos imaturos de muscídeos é de alguma forma saprófago, sejam carnívoros, não carnívoros ou coprófagos (Skidmore 1985). No entanto, hábitos mais especializados são também encontrados (Skidmore 1985): as larvas de Eginini são parasitas de Diplopoda; as de gêneros como *Cariocamyia*, *Charadrella*, *Ochromusca*, *Alluaudinella* e *Aethiopomyia* se desenvolvem em Gastropoda terrestres; a fitofagia é registrada em algumas larvas de *Atherigona*; as de Limnophorini são predadoras em ambientes aquáticos; as de *Philornis* e *Passeromyia* vivem associadas a pássaros ou seus ninhos. No caso de *Philornis*, são tanto encontradas larvas coprófagas, semi-hematófagas e hematófagas subcutâneas que habitam os ninhos de seus hospedeiros, quanto hematófagas subcutâneas (Couri *et al.* 2007). Quanto aos Muscidae adultos, a maioria é saprófaga, mas são encontradas espécies antófilas (algumas espécies de *Graphomya*), hematófagas (alguns Muscinae) e predadores de outros insetos (Coenosiini e Limnophorini) (Skidmore 1985).

As três principais linhagens de Muscidae, conforme definidas neste trabalho, Muscinae, Cyrtonneurinae e Mydaeinae divergiram aproximadamente entre 50 e 35 MA. Nesta época, os continentes do sul ainda estavam conectados através da Antártica, provendo uma possível rota de intercâmbio. Estima-se que Austrália e América do Sul mantiveram conexão via Antártica até cerca de 32 MA, enquanto a África isolou-se destes muito antes, tendo completado a sua desconexão da América do Sul há cerca de 105 MA (McLoughlin 2001). Adicionalmente, embora o Istmo do Panamá ainda estivesse submerso, o que viria a ser as Grandes Antilhas provia uma rota de expansão de área para a biota entre o norte e o sul do continente americano no fim do Eoceno, entre 33 e 35 MA (Antonelli & Sanmartín 2011). Durante o Cenozóico, uma série de transformações ocorreram na geologia da região Neotropical, sendo a formação dos Andes uma das mais impactantes. A cordilheira teve um longo período de soerguimento, que

começou no sul e se estendeu para o norte até 2,5 MA (Hoorn *et al.* 2010). O surgimento da cordilheira, que se intensificou a partir do final do Eoceno, há 34 MA, criou nichos totalmente novos ao longo da cadeia em si, mas também provocou diversas mudanças no clima do continente e criou novos ambientes (Antonelli & Sanmartín 2011). Estes eventos, entre outros, como a formação do mar amazônico ocorrida há cerca de 10 MA (Webb 1995), provavelmente promoveram diversos eventos de isolamento dentre as espécies de Muscidae da região, e posteriormente a sua divergência, já que até cerca de 10 MA a maior parte dos gêneros de presentes nesta análise já haviam divergido. Eventos de divergência entre espécies continuaram acontecendo até menos de 1 MA, podendo ser explicados por fenômenos ainda mais recentes, como eventos de glaciação ocorridos ao longo do Pleistoceno.

O cenário de evolução espacial e temporal sugerido pelos resultados deste trabalho é bem diverso daqueles anteriormente propostos para a família. Para Hennig (1965), os muscídeos teriam se originado no hemisfério norte, e se dispersaram até a América do Sul em épocas diferentes, o que seria evidenciado pela presença no continente de espécies pertencentes a linhagens diferentes. Os relacionamentos encontrados neste trabalho são compatíveis com a hipótese de múltiplas invasões, já que as linhagens sul-americanas não formam um grupo monofilético. No entanto, os relacionamentos encontrados, bem como os tempos de divergência, sugerem que além de processos de expansão de área pelo norte do continente, as trocas com a Australásia pelo sul foram igualmente importantes na formação da biota dos muscídeos da América do Sul. Da mesma forma, o tempo de divergência encontrado entre Muscidae e Anthomyiidae não é congruente com o cenário biogeográfico proposto por Couri & Carvalho (2003), em que a evolução espacial de Muscidae teria sido afetada pela quebra do Gondwana, incluindo a separação da África do restante das massas continentais do hemisfério sul. Os autores propuseram esta narrativa baseados no relacionamento próximo encontrado entre gêneros endêmicos da região neotropical e da paleotropical em dois clados distintos. Os idades aqui encontradas são congruentes apenas com um cenário em que Muscidae é afetado parcialmente pela quebra do Gondwana, na separação entre América do Sul, Antártica e Austrália.

A divergência da linhagem de Muscinae, Clado 1 (Fig. 24), foi estimada entre 50 a 37 MA, a mais antiga dentre as três principais. Os Muscinae hematófagos (aqui representados por *Haematobosca*, *Neivamyia*, *Rhinomusca* e *Stomoxys*) tiveram a divergência estimada entre 31 e 18 MA, condizente, mas um pouco mais restrita do que aquela estimada pelo estudo específico

da tribo, entre 40 e 22 MA (Dsouli *et al.* 2011). Conforme visto acima, existem poucas associações específicas conhecidas para Muscidae, sendo a associação entre *Rhinomusca* e os rinocerontes africanos uma interessante exceção, onde os imaturos se desenvolvem em fezes dos rinocerontes, e os adultos sugam o sangue dos mesmos (Skidmore 1985). Rhinocerotidae, família a qual os rinocerontes pertencem, divergiu de Tapiridae (antas) entre 49 e 54 MA (Steiner & Ryder 2011). No entanto, a associação com *Rhinomusca* é apenas conhecida para as espécies africanas, *Ceratotherium simum* (Burchell, 1817), o rinoceronte branco e *Diceros bicornis* (Linnaeus, 1758), o rinoceronte negro. A divergência entre os rinocerontes de Sumatra e a linhagem destas espécies foi estimada entre 30 e 19 MA (Steiner & Ryder 2011), enquanto a divergência entre *Neivamyia flavicornis* e *Rhinomusca dutoiti* foi estimada entre 26,5 e 13,5 MA. Assim, existe compatibilidade entre o surgimento do recurso e a divergência de *Rhinomusca*.

A idade dos Cyrtoneurinae, equivalente ao Clado 2 (Fig. 24) foi estimada entre 49 e 37 MA. Este clado contém principalmente gêneros neotropicais, mas também contém *Atherigona*, um gênero essencialmente paleotropical, e *Muscina*, essencialmente holoártico. Dentre as linhagens da América do Sul recuperadas neste clado, encontra-se o Gênero Novo, com distribuição na porção equatoriana dos Andes, e cuja divergência foi estimada entre 21 e 3 MA. É possível, então que a formação dos Andes esteja relacionada a diversificação desta linhagem. No cronograma recuperado, algumas espécies de *Cyrtoneuropsis*, *Cariocamyia* e *Prohardyia* encontram-se em um clado à parte dos Cyrtoneurinae, mas é interessante como a relação entre estes gêneros foi mais uma vez recuperada. A divergência entre *Prohardyia* e os *Cyrtoneuropsis* foi estimada entre 39 e 23 MA, período em que as regiões australasiana, onde *Prohardyia* ocorre, e neotropical, onde *Cyrtoneuropsis* ocorre, ainda estavam conectadas via Antártica.

Mydaeini, o Clado 3a (Fig. 24) teve a divergência estimada em 39 a 27 MA, e corresponde possivelmente à radiação mais recente dentre as principais linhagens Muscidae. A linhagem de Limnophorini, equivalente ao Clado 3b1 teve a idade estimada em 42-30 MA, e aquela equivalente ao clado 3b2 teve a idade estimada em 40-28 MA. Os membros dos clados supra citados não possuem ligações ecológicas específicas conhecidas que permitam discutir as implicações das datações inferidas. No entanto, é interessante notar que os Coenosiini neotropicais formaram um clado (exceto por *Bithoracochaeta calopus*) com divergência bastante recente (entre 21 e 10 MA). Porém a amostragem e o suporte indicam que tais resultados devam ser vistos com cautela.

5. Considerações finais

Apesar das diferenças entre as hipóteses filogenéticas geradas por diferentes critérios e tratamentos dos dados, os três principais clados, Muscinae, Cyrtoneurinae e Mydaeinae foram encontrados em praticamente todas as análises (16 de um total de 18 análises que convergiram), dando maior confiança aos relacionamentos encontrados. Os relacionamentos aqui recuperados encontram suporte em hipóteses dos principais trabalhos com a filogenia e morfologia de Muscidae, tanto com adultos (Hennig 1965, Carvalho 1989), quanto imaturos (Skidmore 1985). Apesar dos esforços empregados, a dificuldade na obtenção de larvas e ovos faz com que diversos gêneros possuam pouca ou nenhuma informação a esse respeito. Quando estão disponíveis, por vezes os caracteres de diferentes semaforontes são conflitantes. Isto não é nenhuma surpresa, já que até mesmo dentro de um mesmo estágio de desenvolvimento estados de caracteres indicando diferentes relacionamentos são comuns. No entanto, a falta de estudos detalhados em morfologia larval pode estar ofuscando caracteres relevantes sob um ponto de vista filogenético. Recentemente, estudos usando microscopia óptica e eletrônica de varredura esclareceram detalhes das estruturas de algumas espécies (Grzywacz 2013, Grzywacz *et al.* 2013), mas ainda há grande diversidade a ser estudada até que qualquer uso filogenético possa ser feito destes avanços. Apesar destas dificuldades, ressalta-se que os relacionamentos aqui encontrados levam a crer que uma estimativa robusta da filogenia de Muscidae a partir de dados morfológicos precisará tanto de caracteres de adultos quanto de imaturos, conforme apontado anteriormente por Carvalho (1989).

Os resultados apresentados iluminam algumas questões tanto a respeito das relações filogenéticas quanto dos tempos de divergência de Muscidae. Mas também geram questões, cujas respostas dependem da inclusão de outros táxons terminais, como os gêneros cujas larvas se desenvolvem em Gastropoda. Também seria interessante a inclusão de espécies de Egiiniini, cujo posicionamento em Muscidae ainda não possui suporte filogenético. Da mesma forma, assim como este trabalho expandiu o número de terminais neotropicais incluídos na filogenia da família, é preciso também trabalhar para expandir a representação das linhagens paleotropicals e australasianas, o que seria de grande utilidade para inferências a respeito da evolução espacial de Muscidae. Além disso, uma análise biogeográfica é necessária para explorar mais eficientemente

os resultados da análise dos tempos de divergência. Apesar da ausência desses táxons, a amostragem utilizada neste trabalho é a mais abrangente e completa utilizada até o momento para a família, e a filogenia resultante poderá ser utilizada como base para estudos filogenéticos mais específicos. Da mesma forma, a hipótese a respeito dos relacionamentos e os tempos de divergência aqui recuperados poderão servir de base para estudos biogeográficos que possam fazer inferências mais realistas a respeito dos processos que influenciaram a evolução de Muscidae, levando em conta o fator temporal.

6. Referências

- D’Almeida, J.M. 1994. Ovipositional substrates used by Calyptratae Diptera in Tijuca forest, Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 261-264.
- Antonelli, A., Sanmartín, I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60, 403–414.
- Bazinet, A.L., Cummings, M.P. 2011. Computing the Tree of Life - Leveraging the Power of Desktop and Service Grids. In: *Proceedings of the Fifth Workshop on Desktop Grids and Volunteer Computing Systems (PCGrid 2011)*.
- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Piffaretti, J.C. & Ward, P.I. 2000. Phylogenetic relationships among Muscoidea (Diptera, Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Insect Molecular Biology* 9, 67-74.
- Bradley, M.C., Schmitz, A., Reeder, T.W. 2005. Partitioned Bayesian Analyses, Partition Choice, and the Phylogenetic Relationships of Scincid Lizards. *Systematic Biology* 54, 373-390.
- Brown, W.M., George, M.Jr., Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 76, 1967-1971
- Carvalho, C.J.B. de. 1993. *Dolichophaonia*, gen. n. (Diptera, Muscidae, Phaoniinae): descrições, novas combinações, sinónimas e chave para as espécies. *Revista Brasileira de Entomologia* 37, 19-34.
- Carvalho, C.J.B. de. 1989. Classificação de Muscidae (Diptera): uma proposta através da análise cladística. *Revista Brasileira de Zoologia* 6, 627-648.
- Carvalho, C.J.B. de (Ed.). 2002. Muscidae (Diptera) of the Neotropical region: taxonomy. Editora Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Carvalho, C.J.B. de, Bortolanza, M., Cardoso da Silva, M.C., Soares, E.D.G. 2003. Distributional patterns of the Neotropical Muscidae (Diptera), in: Morrone, J.J., Llorente

- J.B. (Eds.), Una perspectiva Latinoamericana de la Biogeografía. Las Prensas de Ciencia, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, pp. 263-274.
- Carvalho, C.J.B. de, Couri, M.S., Pont, A.C., Pamplona, D.M., Lopes, S.M. 1993. Part II, Muscidae, in Carvalho, C.J.B. de (Ed.), A catalogue of the Fanniidae and Muscidae (Diptera) of the neotropical region. Sociedade Brasileira de Entomologia, pp. II1-II201.
- Carvalho, C.J.B. de, Couri, M.S., Pont, A.C., Pamplona, D.M., Lopes, S.M. 2005. A Catalogue of the Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region. Zootaxa 860, 1-282.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Molecular Biology and Evolution 17, 540-552. Servidor online disponível em: http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html
- Couri, M.S. 2007. A key to the Afrotropical genera of Muscidae (Diptera). Revista Brasileira de Zoologia 24, 175-184.
- Couri, M.S. 2010. Key to Australasian and Oceanic genera of Muscidae (Diptera). Revista Brasileira de Entomologia 54, 529-544.
- Couri, M.S., Carvalho, C.J.B. de. 1992. Sobre a identidade de *Hemixanthomya marginata* Albuquerque, 1954 e considerações sobre a posição sistemática de *Scutellomusca* Townsend, 1931 (Diptera, Muscidae). Revista Brasileira de Biologia 52, 93-97.
- Couri, M.S., Carvalho, C.J.B. de. 2003. Systematic relations among *Philornis* Meinert, *Passeromyia* Rodhain & Villeneuve and allied genera (Diptera, Muscidae). Brazilian Journal of Biology 63, 223-232.
- Couri, M.S., Pont, A. 2000. Cladistic analysis of Coenosiini (Diptera: Muscidae: Coenosiinae). Systematic Entomology 25, 373-392.
- Couri, M.S., Carvalho, C.J.B. de., Löwenberg-Neto, P. 2007 Phylogeny of *Philornis* Meinert species (Diptera: Muscidae). Zootaxa 1530, 19–26.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9, 772.
- Dikow, T. 2009. A phylogenetic hypothesis for Asilidae based on a total evidence analysis of morphological and DNA sequence data (Insecta: Diptera: Brachycera: Asiloidea). Organisms, Diversity & Evolution 9, 165-188.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S. 1991. ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Research 19, 4008.
- Drummond A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biology 4, e88.

- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Rawlence, N., Rambaut, A. 2007. A rough guide to BEAST 1.4. disponível em:
http://beast-mcmc.googlecode.com/files/BEAST14_Manual_6July2007.pdf
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29, 1969–1973.
- Dsouli, N., Delsuc, F., Michaux, J., Stordeur, E. de, Couloux, A., Veuille, M., Duvallet, G. 2011. Phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear data in haematophagous flies support the paraphyly of the genus *Stomoxys* (Diptera: Muscidae). *Infection, Genetics and Evolution* 11, 663-70.
- Dunn, K.A., McEachran, J.D., Honeycutt, R.L. 2003. Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27, 259–270.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792-1797.
- Evenhuis, N.L. 2014a. Catalogue of the fossil flies of the world, online version. Disponível em:
<http://hbs.bishopmuseum.org/fossilcat/>
- Evenhuis, N.L. 2014. Family Muscidae, in: Evenhuis, N.L. (Ed.), *Catalog of the Diptera of the Australasian and Oceanian Regions*. (online version). Disponível em:
<http://hbs.bishopmuseum.org/aocat/hybotidae.html>
- Fan, Y., Wu, R. Chen, M.-H., Kuo, L., Lewis, P.O. 2011. Choosing among partition models in Bayesian phylogenetics. *Systematic Biology* 28, 523-532.
- Felsenstein, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology*, 27 401-410.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294–299.
- Gibson, J.F., Skevington, J.H., Kelso, S. 2010. Placement of Conopidae (Diptera) within Schizophora based on mtDNA and nrDNA gene regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 91-103.
- Gibson, J.F., Kelso, S., Jackson, M.D., Kits, J.H., Miranda, G.F.G., Skevington, J.H. 2011. Diptera-specific polymerase chain reaction amplification primers of use in molecular phylogenetic research. *Annals of the Entomological Society of America* 74, 976-997.
- Goloboff, P.A. 1999. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics* 15, 415–428.

- Goloboff, P., Farris, S., Nixon, K. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24, 774-786.
- Gregor, F., Rozkošný, R., Barták, M., Vaňhara, J. 2003. The Muscidae (Diptera) of Central Europe. Masaryk University, Brno.
- Grzywacz, A. 2013. Third instar larva morphology of *Hydrotaea cyrtoneurina* (Zetterstedt, 1845) (Diptera: Muscidae) – a species of forensic interest. *Polish Journal of Entomology* 82, 303-315.
- Grzywacz, A., Pape, T., Hudson, W.G., Gomez, S. 2013. Morphology of immature stages of *Atherigona reversura* (Diptera: Muscidae), with notes on the recent invasion of North America. *Journal of Natural History* 47, 1055-1067.
- Haseyama, K.L.F., Carvalho, C.J.B. de. 2012a. Taxonomy and phylogeny of the Neotropical genus *Charadrella* Wulp (Diptera, Muscidae). *Invertebrate Systematics* 26, 399–416.
- Haseyama, K.L.F., Carvalho, C.J.B. de. 2012b. A new species of *Cyrtoneuropsis* (Diptera: Muscidae) with considerations on the phylogeny of the genus. *Zoologia* 29, 549–556.
- Heath, T.A., Hedtke, S.M., Hillis, D.M. 2008. Taxon sampling and the accuracy of phylogenetic analyses. *Journal of Systematics and Evolution* 46, 239–257.
- Hennig, W. 1965. Vorarbeiten zu einem phylogenetischen System der Muscidae (Diptera: Cyclororrapha). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde* 141, 1-100.
- Hennig, W. 1973. Diptera. In: W. Kükenthal (Ed.). *Handbuch der Zoologie*, IV: Arthropoda de Gruyter. New York, 1-337.
- Hoorn, C., Wesselingh, F.P., Steege, H. Ter, Bermudez, M.A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I. Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C.L., Figueiredo, J. P., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F.R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T., Antonelli, A. 2010. Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. *Science* 330, 927-931.
- Huelsenbeck, J.P., Rannala, B. 2004. Frequentist properties of bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic Biology* 53, 904-913.
- Iturralde-Vinent, M.A., MacPhee, R.D.E. 1996. Age and paleogeographical origin of Dominican amber. *Science* 5283, 1850-1852.
- Kass, R.E., Raftery, A.E. 1995. Bayes factors. *Journal of the American Statistic Association* 90, 773-795.
- Kutty, S.N., Pape, T., Pont, A., Wiegmann, B.M., Meier, R. 2008. The Muscoidea (Diptera: Calypterae) are paraphyletic: Evidence from four mitochondrial and four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 639-652.

- Kutty, S.N., Pape, T., Wiegmann, B.M., Meier, R. 2010. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Systematic Entomology* 35, 614-635.
- Lambkin, C., Sinclair, B.J., Papae, T., Courtney, G., Skevington, J.H., Meier, R., Yeates, D.K., Blagoderov, V., Wiegmann, B.M. 2013. The phylogenetic relationships among infraorders and superfamilies of Diptera based on morphological evidence. *Systematic Entomology* 38, 164-179.
- Lewis, P.O. 1998. Maximum likelihood as an alternative to parsimony for inferring phylogeny using nucleotide sequence data, in Soltis, D., Soltis, P., Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular Systematics of Plants II*. Springer, Nova York, pp. 132-163.
- Linder, H.P., Hardy, C.R., Rutschmann F. 2005. Taxon sampling effects in molecular clock dating: An example from the African Restionaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35, 569-582.
- Löwenberg-Neto, P., Carvalho, C.J.B. de. 2011. Tropical niche conservatism as a historical narrative hypothesis for the Neotropics: a case study using the fly family Muscidae. *Journal of Biogeography* 38, 1936-1947.
- McLoughlin, S. 2001. The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic floristic provincialism. *Australian Journal of Botany* 49, 271-300.
- McAlpine, J.F. 1989. Phylogeny and classification of the Muscomorpha, in: McAlpine, J.F., Wood, D.M. (Eds.), *Manual of Nearctic Diptera Volume 3*. Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa, pp. 1382-1391.
- Meier, R., Wiegmann, B.M. 2002. A phylogenetic analysis of Coelopidae (Diptera) based on morphological and DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25, 393-407.
- Michelsen, V. 1991. Revision of the aberrant New World genus *Coenosopsia* (Diptera: Anthomyiidae) with a discussion of anthomyiid relationships. *Systematic Entomology* 16, 85-104.
- Michelsen, V. 2000. Oldest authentic record of a fossil calyptratae fly (Diptera): a species of Anthomyiidae from early Cenozoic Baltic Amber. *Studia Dipterologica* 7, 11-18.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proc. Gateway Computing Environments Workshop (GCE 2010)*, 14 November 2010, New Orleans, Louisiana. Institute of Electrical and Electronics Engineers, 1-8.
- Moulton, J.K., Wiegman, B.M. 2003. Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31, 363-378.

- Newton, M.A., Raftery A.E. 1994. Approximate Bayesian inference with the weighted likelihood bootstrap (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* 56, 3-48.
- Nihei, S.S., Carvalho, C.J.B. de. 2004a. Taxonomy, cladistics and biogeography of *Coenosopsia* Malloch (Diptera, Anthomyiidae) and its significance to the evolution of anthomyiids in the Neotropics. *Systematic Entomology* 29, 260-275.
- Nihei, S.S., Carvalho, C.J.B. de. 2007a. Phylogeny and classification of Muscini (Diptera, Muscidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 149, 493-532.
- Nihei, S.S., Carvalho, C.J.B. de. 2007b. Systematics and biogeography of *Polietina* Schnabl & Dziedzicki (Diptera, Muscidae): Neotropical area relationships and Amazonia as a composite area. *Systematic Entomology* 32, 477-501.
- Nihei, S.S., Carvalho, C.J.B. de. 2009. The Muscini flies of the world (Diptera, Muscidae): identification key and generic diagnoses. *Zootaxa* 1976, 1-24.
- Nixon, K.C., 1999. The parsimony ratchet a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15, 407-414.
- Nylander, J.A.A., Roquist, F., Huelsenbeck, J.P., Nieves-Aldrey, J.L. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53, 47-67.
- Pamplona, D. 1999. Nova caracterização de *Cyrtoneurina* Giglio-Tos, 1893 e descrição de *Paracyrtoneurina* gen. nov. (Diptera, Muscidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 43, 9-24.
- Pereira-Colavite, A., Carvalho, C.J.B. de. 2012. Taxonomy of *Neomuscina* Townsend (Diptera, Muscidae) from Brazil. *Zootaxa* 3504, 1-55.
- Pape T, Thompson FC. 2013. Family Tables; <http://www.diptera.org/FamilyTables.php>. In: Pape, T., Thompson, F.C. (Eds.), *Systema Dipterorum*, Version 1.0. Disponível em: <http://www.diptera.org/>.
- Pont, A. 1966. Studies on Australian Muscidae (Diptera) I. Some species of *Dichaetomyia* Malloch. *Australian Journal of Zoology* 15, 616-640.
- Pont, A. 1969. Studies on Australian Muscidae (Diptera) III. A revision of the genera with a facial carina. *Australian Journal of Zoology* 17, 919-960.
- Pont, A.C. 1980. Family Muscidae, in Crosskey, R.W. (Ed.), *Catalogue of the Diptera of the Afrotropical Region*. British Museum (Natural History), London, pp. 721-761.
- Pont, A.C. 1986. Family Muscidae. In: Sóos, A., Papp, L. (Eds). *Catalogue of the Palearctic Diptera* vol. 11. Hungarian Natural History Museum, Budapest, pp. 57-215.
- Pont, A.C. 1972. Family Muscidae. A catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States, 97. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo.

- Pont, A.C., Carvalho, C.J.B. de. 1997. Three species of Muscidae (Diptera) from Dominican amber. *Studia Dipterologica* 4, 176-181.
- Rambaut, A., Drummond, A. 2012. FigTree: Tree figure drawing tool, v1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, W., Drummond, A. J. 2013. Tracer v1. 6. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Ganley, A.R.D., Hussey, A., Shi, D., Ball, A. Zwick, B. Stajich, J.E., Cummings, M.P., Martin, J.W., and Cunningham, C.W. 2008. Resolving Arthropod Phylogeny: Exploring Phylogenetic Signal within 41kb of Protein-coding Nuclear Gene Sequence. *Systematic Biology* 57, 920-938.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P. van der, Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61, 539-542.
- Salemi, M. 2009. Genetic distance and substitution models – Practice, in: Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.-M. (Eds), *Phylogenetic Handbook*. Cambridge University Press, 126-140.
- Savage, J., 2003. Revision of the genus *Thricops* Rondani (Diptera: Muscidae). *Insect Systematics & Evolution* sup. 31, 1-143.
- Savage, J., Wheeler, T.A. 2004. Phylogeny of the Azeliini (Diptera Muscidae). *Studia Dipterologica* 11, 259-299.
- Schuehli, G.S., Carvalho, C.J.B. de. 2005. Revision and cladistics of the Neotropical genus *Pseudoptilolepis* Snyder (Diptera, Muscidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 22, 23–34.
- Schuehli, G.S., Carvalho, C.J.B. de, Wiegmann, B.M. 2007. Molecular phylogenetics of the Muscidae (Diptera: Calyptratae): new ideas in a congruence context. *Invertebrate Systematics* 21, 263-278.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87, 651–701.
- Simmons M.P. 2012. Radical instability and spurious branch support by likelihood when applied to matrices with non-random distributions of missing data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62, 472–484.
- Skidmore, P. 1985. *The biology of the Muscidae of the world*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Snyder, 1954. A revision of *Cyrtoneurina* Giglio-Tos, with note on related genera (Diptera, Muscidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 103, 417-464.

- Soares, E. D. G. 2008. Reinwardtiinae (Diptera, Muscidae) é um grupo monofilético?: uma abordagem cladística morfológica e molecular. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, disponível em: http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/15327/1/E.%20D.G.%20Soares_2008_Tese%20de%20Doutorado.pdf
- Stadler, T. 2009. On incomplete sampling under birth–death models and connections to the sampling-based coalescent. *Journal of Theoretical Biology* 261, 58–66.
- Steiner, C.C., Ryder, O.A. 2011. Molecular phylogeny and evolution of the Perissodactyla. *Zoological Journal of the Linnean Society* 163, 1289–1303.
- Sukumaran, J., Holder, M.T. 2010. DendroPy: A Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics* 26, 1569-1571.
- Sullivan, J., Joyce, P. 2005. Model selection in phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36, 445-466.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Talavera, G., Castresana, J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56, 564-577.
- Vaidya G., Lohman, D.J., Meier, R. 2010. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27, 171-180.
- Vockeroth, J.R. 1996. Key to genera of Muscidae (Diptera) of Mexico, Central America, and the West Indies. *Memoirs of the Entomological Society of Washington* 18, 280-288.
- Webb, S.D. 1995. Biological Implications of the middle Miocene Amazon Seaway. *Science* 269, 361-362.
- Wheeler, W.C. 1995. Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data. *Systematic Biology* 44, 321-331.
- Wiegmann, B.M., Yeates, D.K., Thorne, J.L., Kishino, H. 2003. Time flies, a new molecular time-scale for Brachyceran fly evolution without a clock. *Systematic Biology* 52, 745-756.
- Wiegmann, B.M. Mitter, C., Regier, G.C., Friedlander, T.P., Wagner, D.M., Nielsen, E.S. 2000. Nuclear Genes Resolve Mesozoic-Aged Divergences in the Insect Order Lepidoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15, 242–259.
- Wiegmann, B.M., Michelle D.T., Winkler, I.S., Barra, N.B., Kima, J.-W., Lambkin, C., Bertone, M.A., Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, Peterson, K.J., Pape, T.,

- Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov V., Caravas J., Kutty, S.N., Schmidt-Ottm, U., Kampmeiern, G.E., Thompson, C.F., Grimaldi, D.A., Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K. 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5690-5695.
- Wiens, J.J. 2006. Missing data and the design of phylogenetic analysis. *Journal of Biomedical Informatics* 39, 34-42.
- Wiens, J.J., Fetzner, J.W.Jr, Parkinson, C.L., Reeder, T.W. 2005. Hyliid Frog Phylogeny and Sampling Strategies for Speciose Clades. *Systematic Biology* 54, 729-748.
- Wiens, J.J., Moen, D.S. 2008. Missing data and the accuracy of Bayesian phylogenetics. *Journal of Systematics and Evolution* 46, 307-314.
- Wiens, J.J., Morrill, M.C. 2011. Missing data in phylogenetic analysis: reconciling results from simulations and empirical data. *Systematic Biology* 60, 719-731.
- Yang, L., Wiegmann, B.M., Yeates, D.K., Erwin, M.E. 2000. Higher-level phylogeny of the Therevidae (Diptera: Insecta) based on 28S ribosomal and elongation factor-1 α gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15, 440-451.
- Yoder, A.D., Yang, Z. 2004. Divergence dates for Malagasy lemurs estimated from multiple gene loci: geological and evolutionary context. *Molecular Ecology* 13, 757-773.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L., Wang, Y. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 1-7.
- Xia, X. 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30, 1720-1728.
- Xie, W., Lewis, P.O., Fan, Y., Kuo, L., Chen, M.-H. 2011. Improving marginal likelihood estimation for Bayesian phylogenetic model selection. *Systematic Biology* 60, 150-160.
- Zhao, Z., Su, T.-j., Chesters, D., Wang, S.-d., Ho, S.Y.W., Zhu, C.-d., Chen, X., Zhang, C.-t. 2013. The mitochondrial genome of *Elodia Flavipalpis* Aldrich (Diptera: Tachinidae) and the evolutionary timescale of tachinid flies. *PloS one*, 8, e61814.
- Zimin, L.S., Elberg, K.Yu. 1988. Family Muscidae. In: Bei-Bienko, G.Ya., Steyskal, G.C. (Eds.). *Keys to the insects of the European part of the URSS. Volume V. Diptera and Siphonaptera, part II.* Smithsonian Institution Libraries, Nova Deli, pp. 939-974.
- Zwickl, D.J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Tese de doutorado, The University of Texas at Austin.

Tabelas

Tabela 1. Sequências utilizadas e número e acesso ao GenBank. As sequências obtidas durante este trabalho ainda não foram publicadas, e por isso os número de acesso estão representados por um asterisco. As localidades de coleta estão listadas apenas para as sequências adquiridas durante este trabalho. A classificação segue Pont (1980, 1986), Carvalho *et al.* (2005) e Evenhuis (2014). As espécies utilizadas na amostragem reduzida estão indicados em negrito. Códigos da distribuição: Au = australasiana; Co = cosmopolita; Na = neártica; Nt = neotropical; Or = Oriental Pa = paleártica; Pt= paleotropical.

*Comprimento total, em pares de base

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1 α	CO1
Anthomyiidae	Anthomyiinae	Anthomyiini	<i>Botanophila fugax</i> (Meigen, 1826)	Pa	563	-	-	FJ025665	-
Anthomyiidae	Anthomyiinae	Anthomyiini	<i>Delia radicum</i> (Linnaeus, 1758)	Na, Pa	1195	KC178314	KC178409	-	-
Anthomyiidae	Anthomyiinae	Anthomyiini	<i>Eutrichota paratunicata</i> (Hennig, 1973)	Pa	551	-	-	GQ409461	-
Anthomyiidae	Anthomyiinae	Anthomyiini	<i>Hydrophoria lancifer</i> (Harris, 1780)	Na, Pa	1921	-	EF531164	FJ025677	EF531194
Anthomyiidae	Anthomyiinae	Anthomyiini	<i>Hylemya vagans</i> (Panzer, 1798)	Pa	619	-	-	FJ025681	-
Anthomyiidae	Anthomyiinae	Anthomyiini	<i>Hylemya variata</i> (Fällen, 1823)	Na, Pa	619	-	-	FJ025682	-
Anthomyiidae	Anthomyiinae	Anthomyiini	<i>Lasiomma latipenne</i> (Zetterstedt, 1838)	Na, Pa	466	-	-	FJ025683	-
Anthomyiidae	Anthomyiinae	Anthomyiini	<i>Lasiomma seminitidum</i> Zetterstedt, 1845)	Pa	1179	-	-	DQ657112	JX438037
Fanniidae	-	-	<i>Fannia canicularis</i> (Linnaeus, 1761)	Co	1921	-	EF531184	AJ871202	EF531197
Muscidae	Acanthipterinae	-	<i>Acanthiptera rohrelliformis</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	Portugal: Candeeiro / Pa	1606	*	-	*	*
Muscidae	Atherigoninae	-	<i>Atherigona orientalis</i> Schiner, 1868	Brasil: Feira de Santana / Na, Nt, Pa, Pt	2466	*	*	*	*
Muscidae	Atherigoninae	-	<i>Atherigona oryzae</i> Malloch, 1925	Japão: Tóquio / Au, Or, Pa	653	-	-	-	*
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Azelia nebulosa</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	Alemanha: Schöngesing / Pa	609	-	-	*	-
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Drymeia alpicola</i> (Rondani, 1871)	Na, Pa	1495	-	FJ025572	FJ025669	FJ025608
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Drymeia hamata</i> (Fällen, 1823)	Pa	1743	-	FJ025573	FJ025670	FJ025609

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1 α	CO1
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Huckettomyia watanabei</i> Pont & Shinonaga, 1970	Japão: Montanhas Daietsu / Pa	2286	*	*	*	*
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Hydrotaea dentipes</i> (Fabricius, 1805)	Japão: Montanhas Daietsu / Na, Nt, Or, Pa	1856	*	FJ025579	FJ025679	FJ025623
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Hydrotaea irritans</i> (Fällen, 1823)	Pa	1865	-	FJ025580	FJ025680	FJ025624
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Micropotamia</i> sp. 1	Brasil: Manaus / Nt	2471	*	*	*	*
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Potamia littoralis</i> Robineau-Desvoidy, 1830	Na, Or, Pa	1308	-	FJ025598	-	FJ025654
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Thricops aculeipes</i> (Zetterstedt, 1838)	Pa	612	-	-	FJ025699	FJ025660
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Thricops cunctans</i> (Meigen, 1826)	Pa	1682	-	FJ025600	FJ025700	FJ025661
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Thricops diaphanus</i> (Wiedemann, 1817)	Na, Ne, Pa	1683	*	*	-	*
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Thricops genarum</i> (Zetterstedt, 1838)	Pa	1210	-	-	FJ025701	FJ025662
Muscidae	Azeliinae	Azeliini	<i>Thricops nigrtellus</i> (Zetterstedt, 1838)	Pa	1072	-	-	FJ025792	FJ025663
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Chaetagenia stigmatica</i> Malloch, 1928	Brasil: Antonina / Nt	1697	*	-	*	*
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Muscina angustifrons</i> (Loew, 1858)	Japão: Tóquio / Or, Pa	1842	*	*	-	*
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Muscina levida</i> (Harris, 1780)	Na, Nt, Pa	1165	-	-	FJ025688	FJ025638
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Muscina pascuorum</i> (Meigen, 1826)	Japão: Tóquio / Or, Na, Pa	1121	*	-	-	*
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Muscina stabulans</i> (Fällen, 1817)	Co	1922	-	EF531167	FJ025689	EF531210
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Philornis blanchardi</i> Garcia, 1984	Nt	1264	-	-	AJ605068	AJ617699
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Philornis downsi</i> Dodge & Aitken 1968	Brasil: Manaus / Nt	641	-	-	-	*
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Philornis falsificus</i> Dodge & Aitken 1968	Brasil: Manaus / Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Philornis niger</i> Dodge & Aitken 1968	Brasil: Manaus / Nt	648	-	-	-	*

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1 α	CO1
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Philornis zeteki</i> Dodge & Aitken 1963	Brasil: Brasília / Nt	2462	*	*	*	*
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Psilochaeta pampiana</i> (Shannon & Del Ponte, 1926)	Brasil: Petrópolis / Nt	1048	*	-	*	-
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Reinwardtia</i> sp. nov.	Equador: Cajanuma	1062	*	-	*	-
Muscidae	Azeliinae	Reinwardtiini	<i>Synthesiomia nudiseta</i> (Wulp, 1883)	Brasil: Feira de Santana / Nt, Pa, Pt	1780	*	*		*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Bithoracochaeta calopus</i> (Bigot, 1885)	Brasil: Curitiba – Nt	2431	*	*	*	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Coenosia testacea</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	Pa	539	-	-	-	FJ025605
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Coenosia tigrina</i> (Fabricius, 1775)	Na, Pa	1124	-	FJ025770	-	FJ025606
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Cordiluroides megalopyga</i> Albuquerque, 1954	Nt	612	-	-	-	AJ879590
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Cordiluroides</i> sp. 1	Equador: Cajanuma	278	*	-	-	-
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Cordiluroides</i> sp. 2	Brasil: Camacan	437	-	-	-	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Lispocephala miki</i> (Strobl, 1893)	Japão: Tóquio / Pa, Pt	2318	*	*	*	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Neodexiopsis paranaensis</i> Costacurta, Couri & Carvalho, 2005	Brasil: Ponta Grossa / Nt	1694	*	-	*	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Neodexiopsis setipuncta</i> Snyder, 1957	Argentina: Tucumã / Nt	653	-	-	-	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Orchisia costata</i> (Meigen, 1826)	Japão: Tóquio / Au, Pa, Pt	2291	*	*	*	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Pilisipina</i> sp. 1	Brasil: Camacan	359	*	-	-	-
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Pygophora confusa</i> Stein, 1919	Japão: Tóquio / Or, Pa	2415	*	*	*	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Plumispina</i> sp. 1	Brasil: Wenceslau Guimarães	1077	*	-	*	-

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1 α	CO1
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Schoenomyza</i> sp. 1	EUA: Limestone Creek	2431	*	*	*	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Spathipheromyia</i> sp. 1	Brasil: Guaratuba	1164	-	-	*	*
Muscidae	Coenosiinae	Coenosiini	<i>Villeneuveia aestuum</i> (Villeneuve, 1902)	Pa	603	-	-	FJ025664	-
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Limnophora deleta</i> (Wulp, 1896)	Nt	850	-	-	AJ871204	AJ879594
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Limnophora exuta</i> (Kowarz, 1893)	Nt, Pa	1330	-	FJ025581	FJ025684	FJ025626
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Limnophora maculosa</i> (Meigen, 1826)	Pa	1928	-	FJ025582	FJ025685	FJ025627
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Limnophora olympiae</i> Lyneborg, 1965	Pa	1897	-	FJ025628	FJ025583	FJ025686
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Limnophora orbitalis</i> Stein, 1965	Japão: Tokachi / Pa	1826	*	*	-	*
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Limnophora riparia</i> (Fällen, 1824)	Pa	1279	-	FJ025584	-	FJ025629
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Lispe sinica</i> Hennig, 1960	Japão: Tóquio / Na, Or, Pa	1659	*	*	-	*
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Lispe tentaculata</i> de Geer, 1776	Co	1198	-	FJ025585	FJ025687	FJ025630
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Spilogona caliginosa</i> (Stein, 1916)	Pa	578	-	-	-	FJ025657
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Spilogona dispar</i> (Fällen, 1823)	Pa	1143	-	FJ025590	-	FJ025658
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Spilogona japonica</i> Shinonaga, 2000	Japão: Montanhas Daietsu / Pa	1814	*	*	-	*
Muscidae	Coenosiinae	Limnophorini	<i>Syllimnophora</i> sp. 1	Brasil: Camacan	1022	*	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cariocamyia</i> sp. nov.	Brasil: Maringá	1851	*	*	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneurina alifusca</i> Couri, 1982	Costa Rica: Santa Rosa / Nt	1232	-	-	*	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneurina costalis</i> (Walker, 1853)	Brasil: Brasília / Nt	1322	-	*	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneurina geminata</i> (Stein, 1904)	Costa Rica: Santa Rosa / Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis conspersa</i> (Stein, 1911)	Brasil: Manaus / Nt	1147	-	-	*	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis dubia</i> (Snyder, 1954)	Brasil: Manaus / Nt	646	-	-	-	*

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1 α	CO1
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis fuscicosta</i> Curran, 1934	Brasil: Manaus / Nt	655	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis gemina</i> (Wiedemann, 1830)	Colômbia: Corregimiento El Arenal / Nt	484	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis maculipennis</i> (Macquart, 1843)	Nt	1257	-	-	AJ871201	AJ879591
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis multomaculata</i> (Stein, 1904)	Brasil: Manaus / Nt	622	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis neotrita</i> (Snyder, 1954)	Brasil: Manaus / Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis nisae</i> Haseyama & Carvalho, 2012	Brasil: Manaus / Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis paraescita</i> (Couri, 1995)	Brasil: Joinville / Nt	484	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis protosetosa</i> (Snyder, 1954)	Brasil: Manaus / Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis similata</i> (Couri, 1982)	Brasil: Óbidos / Nt	644	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Cyrtoneuropsis veniseta</i> (Stein, 1904)	Brasil: Manaus / Nt	2428	*	*	*	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Neomuscina currani</i> Snyder, 1949	Brasil: São Gabriel da Cachoeira / Nt	1756	*	*	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Neomuscina goianensis</i> Lopes & Khouri, 1995	Brasil: São Gabriel da Cachoeira / Nt	581	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Neomuscina inflexa</i> (Stein, 1918)	Brasil: Curitiba / Nt	1276	-	-	AJ871206	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Neomuscina neosimilis</i> Snyder, 1949	Brasil: Marilândia / Nt	621	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Neomuscina pictipennis pictipennis</i> (Bigot, 1878)	Brasil: Curitiba / Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Neomuscina stabilis</i> (Stein, 1911)	Brasil: Manaus / Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Pseudoptilolepis aff. fluminensis</i> Albuquerque, 1949	Brasil: Barra do Ribeiro	1708	*	*	-	*

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1α	CO1
Muscidae	Cyrtoneurinae	-	<i>Pseudoptilolepis fulvapoda</i> Snyder, 1949	Nt	1245	-	-	AJ871214	AJ879603
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Biopyrellia bipuncta</i> (Wiedemann, 1830)	Brasil: Manaus / Nt	2327	*	*	*	AJ623298
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Curranosia</i> sp. 1	Rep. da África do Sul: Nduno Game	1103	*	*	-	-
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Dasyphora cyanella</i> (Meigen, 1826)	Pa, Pt	1725	-	FJ025574	FJ025671	FJ025611
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Dasyphora cyanicolor</i> (Zetterstedt, 1845)	Japão: Tokachi / Pa	465	*	-	-	-
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Mesembrina meridiana</i> (Linnaeus, 1758)	Pa	1289	-	FJ025586	-	FJ025633
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Mesembrina resplendens</i> Wahlberg, 1844	Japão: Tokachi / Pa	1111	*	-	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Morellia aenescens</i> Robineau-Desvoidy, 1830	Pa	1213	-	FJ025587	-	FJ025634
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Morellia hortorum</i> (Fällen, 1817)	Or, Pa	1271	-	FJ025588	-	FJ025635
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Morellia nigricosta</i> Hough, 1900	Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Morellia obscuripes</i> (Bigot, 1887)	Nt	1262	-	-	AJ605066	AJ617697
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Morellia semimarginata</i> (Stein, 1918)	Brasil: Marilândia / Nt	1823	*	*	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Morellia simplex</i> (Loew, 1857)	Pa	1213	-	FJ025589	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Morellia xanthoptera</i> Pamplona, 1986	Nt	1259	-	-	AJ605065	AJ617696
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Musca autumnalis</i> De Geer, 1776	Or, Na, Nt, Pa, Pt	1300	-	FJ025590	-	FJ025637
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Musca domestica</i> Linnaeus, 1758	Co	2443	KC178316	FJ025591	DQ657113	AF104622
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Neomyia cornicina</i> Walker, 1859	Brasil: Manaus / Co	1808	*	*	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Neomyia timorensis</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	Japão: Tóquio / Au, Or, Pa	650	-	-	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Ophyra aenescens</i> (Wiedemann, 1830)	Brasil: Curitiba / Na, Nt	2384	*	*	*	*

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1α	CO1
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Polietes lardarius</i> (Fabricius, 1781)	Alemanha: Schöngeising / Pa	2327	*	FJ025597	FJ025695	FJ025653
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Polietes nigrolimbatus</i> (Bonsdorff, 1866)	Japão: Montanhas Daietsu / Pa	484	-	-	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Polietina bicolor</i> Albuquerque, 1956	Brasil: Manaus / Nt	484	-	-	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Polietina nigra</i> Couri & Carvalho, 1996	Brasil: Manaus / Nt	656	-	-	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Polietina orbitalis</i> (Stein, 1904)	Costa Rica: Área de Conservação Guanacaste / Nt	2393	*	*	*	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Polietina prima</i> (Couri & Machado, 1990)	Brasil: São Gabriel da Cachoeira / Nt	631	-	-	-	*
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Polietina steini</i> (Enderlein, 1927)	Nt	1264	-	-	AJ871208	AJ879598
Muscidae	Muscinae	Muscini	<i>Sarcopromusca pruna</i> (Shannon & Del Ponte, 1926)	Nt	1033	*	*	-	-
Muscidae	Muscinae	Stomoxyini	<i>Haematobosca stimulans</i> (Meigen, 1824)	Or, Pa	620	-	-	FJ25673	
Muscidae	Muscinae	Stomoxyini	<i>Neivamyia flavicornis</i> (Malloch, 1928)	Brasil: Manaus / Nt	2447	*	*	*	*
Muscidae	Muscinae	Stomoxyini	<i>Rhinomusca dutoiti</i> Zumpt, 1950	Rep. da África do Sul: Nduno Game / Pt	1760	*	*	-	*
Muscidae	Muscinae	Stomoxyini	<i>Stomoxys calcitrans</i> (Linnaeus, 1748)	Co	2339	KC178317	EF531173	FJ025698	EF531216
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Brontaea debilis</i> (Williston, 1896)	Brasil: Ponta Grossa / Na, Nt	1776	*	*	-	*
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Graphomya rufitibia</i> (Stein, 1918)	Japão: Tóquio / Au, Or, Pa	1809	*	*	-	*
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Hebecnema fumosa</i> (Meigen, 1826)	Or, Pa	584	-	-	-	FJ025616
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Hebecnema umbratica</i> (Meigen, 1826)	Japão: Tóquio / Or, Na, Pa	413	-	-	-	*
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Hebecnema vespertina</i> (Fällen, 1823)	Alemanha: Schöngeising / Na, Pa	1743	*	*	-	*

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1α	CO1
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Hemichlora scordalus</i> (Walker, 1861)	Brasil: Comendador Levy Gasparian / Nt	1062	*	-	-	*
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Mydaea affinis</i> Meade, 1891	Japão: Tokachi / Na, Pa	653	-	-	-	*
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Mydaea ancilla</i> (Meigen, 1826)	Pa	1898	-	FJ025592	FJ025690	FJ025639
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Mydaea humeralis</i> Robineu-Desvoidy, 1830	Japão: Tokachi / Pa	707	-	*	-	-
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Mydaea rufinervis</i> (Pokorny, 1889)	Na, Pa	578	-	-	-	FJ025640.2
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Mydaea urbana</i> (Meigen, 1826)	Na, Pa	729	-	FJ025593	FJ025691	FJ02564 1
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Myospila mediatibunda</i> (Fabricius, 1791)	Na, Nt, Or, Pa	1927	-	FJ025594	FJ025692	HM389225
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Myospila</i> sp. 1	Brasil: São Gabriel da Cachoeira	2417	*	*	*	*
Muscidae	Mydaeinae	-	<i>Scutellomusca scutellaris</i> (Fabricius, 1805)	Brasil: Marilândia / Nt	2330	*	*	*	*
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Dolichophaonia santoamarensis</i> (Albuquerque, 1958)	Brasil: Camacan / Nt	959	*	-	*	-
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Helina celsa</i> (Harris, 1780)	Pa	1163	-	-	FJ025674	FJ025618
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Helina evecta</i> (Harris, 1780)	Japão: Tóquio / Ne, Nt, Or, Pa, Pt	1641	*	-	FJ025619	FJ025619
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Helina impuncta</i> (Fällen, 1825)	Pa	1193	-	-	FJ025676	FJ025620
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Helina lasiophthalma</i> (Macquart, 1835)	Pa	1893	-	FJ025577	AJ605067	FJ025621
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Phaonia angelicae fuscitibia</i> Shinonaga & Kano, 1971	Japão: Montanhas Daietsu / Pa	1369	-	*	-	*
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Phaonia subventa</i> (Harris, 1780)	Pa	603	-	-	-	FJ025652
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Phaonia tuguriorum</i> (Scopoli, 1763)	Pa	644	-	-	-	AJ617700
Muscidae	Phaoninae	Phaoniini	<i>Prohardyia</i> sp. 1	Australia: Black Mountain	2279	*	*	*	*

Família	Sufamília	Tribo	Espécie	Localidade de coleta / distribuição	PB*	AATS	CAD	EF1 α	CO1
Muscidae	Phaoniinae	Dichaetomyiini	<i>Dichaetomyia bibax</i> (Wiedemann, 1830)	Japão: Tóquio / Or, Pa	2375	*	*	*	*
Muscidae	Phaoniinae	Dichaetomyiini	<i>Dichaetomyia johannis</i> Pont, 1967	Austrália: Beven Emy	2209	*	*	*	*
Muscidae	?	?	Gênero novo	Equador: Cajanuma	573	-	-	*	-

Tabela 2. Iniciadores utilizados no trabalho, com suas respectivas sequências e referências.

Gene	Iniciador	Sequência	Referência
AATS	M13A1x 92f	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TAY CAY CAY ACN TTY TTY GAR ATG	Regier <i>et al.</i> 2008
	95f	ACG TTT TTT GAG ATG YTD GG	Jerome Regier, com. pess.
	M13rA1x 244r	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATN CCR CAR TCN ATR TGY TT	
	253r	GAA CGC TTG GTY TCW GTT AT	
	M13rA1x 322r	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACR TAN CCN CGN CCN GTR TT	
CAD	787f	GGD GTN ACN ACN GCN TGY TTY GAR CC	Moulton & Wiegmann 2003
	806f	GTN GTN AAR ATG CCN MGN TGG GA	
	1098f	TTN GGN AGY TGN CCN CCC AT	
	1124r	CAT NCG NGA RAA YTT RAA RCG ATT YTC	
EF1 α	rcEF4f	GAR CGT GGT ATY ACM ATT GA	Yang <i>et al.</i> 2000
	EF5r	CTC ATA TCA CGT ACA GCR AAR CG	
	EF2f	GGA TGG CAY GGY GAC AAC ATG	Meier & Wigmann 2002
	musEF2f	GGH TGG CAY GGY GAY AAC ATG	Brian Cassel, com. pess.*
COI	LCO-1490f	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Folmer <i>et al.</i> 1994
	HCO-2198r	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	
	C1-N-2191r	GAA GTT TAT ATT TTA ATT TTA CCG GG	Simon <i>et al.</i> 1994
	C1-N-2329r	ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CA	

*Iniciador desenhado para este trabalho.

Tabela 3. Resumo das análises filogenéticas realizadas e resultados. Para cada esquema de particionamento, apresenta-se as relações encontradas entre os três principais clados, conforme a Figura 24, para cada um dos critérios de otimalidade utilizados. O Clado 1 equivale a Muscinae, o Clado 2 a Cyrtoneurinae e o Clado 3 a Mydaeinae. Os cladogramas indicados em **negrito** são aqueles que convergiram, no sentido utilizado neste trabalho. Para a parcimônia, nenhum critério de convergência foi utilizado.

	Sem partição (SP)		Particionamento por gene (GENE)		Particionamento por gene com o CO1 sem as 3 ^{as} posições (CO1s3)		Particionamento por gene e com 1 ^{as} e 2 ^{as} posições separadas das 3 ^{as} (GENE123)	
	Dados reduzidos (SP_RED)	Dados completos (SP_COMP)	Dados reduzidos (GENE_RED)	Dados completos (GENE_COMP)	Dados reduzidos (CO1s3_RED)	Dados completos (CO1s3_COMP)	Dados reduzidos (GENE123_RED)	Dados completos (GENE123_COMP)
Probabilidades posteriores bayesianas (PPB)	(2 (1,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1, 2, 3)	(1 (2,3))	(1 (2,3))
Máxima verossimilhança (MV)	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))	(1 (2,3))
Parcimônia (Pa)	(1 (2,3))	(1 (2,3))	Inaplicável		(1 (2,3))*	(1 (2,3))*	Inaplicável	

*Como os esquemas de particionamento não são aplicáveis à parcimônia, estas análises referem-se a àquelas feitas com alinhamentos onde as terceiras posições do CO1 foram retiradas.

Tabela 4. Modelos indicados para cada gene ou partição, de acordo com os testes de AIC e BIC. Nos casos de divergência entre as respostas, indica-se em **negrito** aquela favorecida pelo LRT. 52

Gene ou partição	Teste AIC	Teste BIC
AATS, completo	GTR+I+ Γ	GTR+I+ Γ
AATS, primeiras e segundas posições	GTR+ Γ	K80+ Γ
CAD, completo	GTR+I+ Γ	SYM+I+Γ
CAD, primeiras e segundas posições	GTR+I+ Γ	GTR+I+ Γ
EF1 α , completo	GTR+I+ Γ	GTR+I+ Γ
EF1 α , primeiras e segundas posições	GTR+I+ Γ	HKY+I+Γ
CO1, completo	GTR+I+ Γ	GTR+I+ Γ
CO1, primeiras e segundas posições	GTR+I+ Γ	GTR+I+ Γ
CO1, terceiras posições	HKY+I+Γ	GTR+I+ Γ
Todos os genes combinados	GTR+I+ Γ	GTR+I+ Γ

Tabela 5. Valores do desvio padrão das *split frequencies* médias e máximas, por esquema de particionamento, para o conjunto de dados reduzido e completo.

Conjunto de dados / Esquema de particionamento	Reduzido		Completo	
	Média	Máxima	Média	Máxima
‘SP’	0.0028	0.0161	0.0101	0.0985
‘GENE’	0.0029	0.0129	0.0066	0.0466
‘GENE123’	0.0190	0.0897	0.0803	0.7070
‘CO1s3’	0.0376	0.1878	0.0118	0.1295

Tabela 6. Valores da verossimilhança marginal obtidos pelo método da média harmônica, por esquema de particionamento, para os conjuntos de dados reduzidos e completos. Valores em logaritmo negativo (-lnL).

Conjunto de dados / Esquema de particionamento	Reduzido	Completo
‘SP’	36446.32	49593.64
‘GENE’	35898.02	48697.54
‘GENE123’	35862.50	49240.55
‘CO1s3’	29232.87	36196.49

Tabela 7. Comparação dos fatores de Bayes, usando as verossimilhanças marginais obtidas pelo método da média harmônica, entre os esquemas de particionamento, para os dados reduzidos e completos. As colunas foram arbitrariamente selecionadas para serem o P_0 , e por isso números positivos indicam que o modelo da linha é favorecido em relação ao da coluna.

Dados reduzidos				
Esquema de particionamento	‘SP’	‘GENE’	‘GENE123’	‘CO1s3’
‘SP’	0	.	.	.
‘GENE’	548.3	0	.	.
‘GENE123’	583.5	35.52	0	.
‘CO1s3’	7213.45	6665.15	7213.45	0
Dados totais				
Esquema de particionamento	‘SP’	‘GENE’	‘GENE123’	‘CO1s3’
‘SP’	0	.	.	.
‘GENE’	896.01	0	.	.
‘GENE123’	353.09	-543.01	0	.
‘CO1s3’	13397.15	12501.05	13044.66	0

Tabela 8. Valores da verossimilhança marginal calculados pelo procedimento de “*stepping-stone*”, por esquema de particionamento, para os conjuntos de dados reduzidos e completos. Valores em logaritmo negativo ($-\ln L$).

Conjunto de dados / Esquema de particionamento	Reduzido	Completo
‘SP’	39169.13	55276.47
‘GENE’	38401.18	54141.11
‘GENE123’	37760.57	53671.20
‘CO1s3’	31480.41	40366.98

Tabela 9. Comparação dos fatores de Bayes, usando as verossimilhanças marginais calculadas pelo procedimento de “*stepping-stone*”, entre os esquemas de particionamento, para os conjuntos de dados reduzidos e completos. As colunas foram arbitrariamente selecionadas para serem o P_0 , e por isso números positivos indicam que a partição da linha é favorecida em relação ao da coluna.

Dados reduzidos				
Esquema de particionamento	‘SP’	‘GENE’	‘GENE123’	‘CO1s3’
‘SP’	0	.	.	.
‘GENE’	767.95	0	.	.
‘GENE123’	1408.56	640.61	0	.
‘CO1s3’	7688.72	6920.77	6280.16	0
Dados totais				
Esquema de particionamento	‘SP’	‘GENE’	‘GENE123’	‘CO1s3’
‘SP’	0	.	.	.
‘GENE’	1135.36	0	.	.
‘GENE123’	1605.27	469.91	0	.
‘CO1s3’	14909.49	12501.05	13304.22	0

Tabela 10. Comparação entre a classificação atual e a proposta deste trabalho. A classificação atual foi baseada na proposta do catálogo de Muscidae para a região Neotropical (Carvalho *et al.* 2005) com a adição das tribos Dichaetomyiini e Phaoniini (Phaoninae). Para gêneros presentes exclusivamente em outras regiões, foram utilizados catálogos correspondentes (Pont 1980, 1986, Evenhuis 2014).

Nova proposta de classificação		Gêneros	Classificação atual	
Subfamília	Tribo		Tribo	Subfamília
Muscinae	-	<i>Achanthiptera</i>	-	Achanthipterinae
		<i>Biopyrellia</i> <i>Curranosia</i> <i>Dasyphora</i> <i>Mesembrina</i> <i>Morellia</i> <i>Musca</i> <i>Neomyia</i> <i>Polietes</i> <i>Polietina</i> <i>Sarcopromusca</i>	Muscini	Muscinae
		<i>Haematobosca</i> <i>Neivamyia</i> <i>Rhinomusca</i> <i>Stomoxys</i>	Stomoxyini	
		<i>Azelia</i> <i>Drymeia</i> <i>Hydrotaea</i> <i>Huckettomyia</i> <i>Micropotamia</i> <i>Ophyra</i> <i>Potamia</i> <i>Thricops</i>	Azeliini	Azeliinae , em parte
Cyrtoneurinae	-	<i>Chaetagenia</i> <i>Muscina</i> <i>Philornis</i> <i>Psilochaeta</i> <i>Synthesiomyia</i>	Reinwardtiini, em parte	
		<i>Atherigona</i>	-	Atherigoninae
		<i>Cyrtoneurina</i> <i>Cyrtoneuropsis</i> <i>Neomuscina</i> <i>Pseudoptilolepis</i>	-	Cyrtoneurinae , em parte
		<i>Hemichlora</i> <i>Scutellomusca</i>	-	Mydaeinae , em parte

Nova proposta de classificação		Gêneros	Classificação atual	
Subfamília	Tribo		Tribo	Subfamília
Mydaeinae	Mydaeini	<i>Dichaetomyia</i>	Dichaetomyiini	Phaoninae , em parte
		<i>Helina</i> <i>Phaonia</i>	Phaoniini, em parte	
		<i>Hebecnema</i> <i>Mydaea</i>	-	Mydaeinae , em parte
	Limnophorini	<i>Brontaea</i> <i>Graphomya</i> <i>Myospila</i>		
		<i>Limnophora</i> <i>Lispe</i> <i>Spilogona</i> <i>Syllimnophora</i>	Limnophorini	Coenosiinae
		<i>Bithoracochaeta</i> <i>Coenosia</i> <i>Cordiluroides</i> <i>Lispocephala</i> <i>Neodexiopsis</i> <i>Orchisia</i> <i>Pilispina</i> <i>Plumispina</i> <i>Pygophora</i> <i>Schoenomyza</i> <i>Spathipheromyia</i>	Coenosiini	
	<i>Incertae sedis</i>	<i>Cariocamyia</i>	-	
		<i>Dolichophaonia</i> <i>Prohardyia</i>	Phaoniini	
	<i>Incertae sedis</i>	<i>Reinwardtia</i>	Reinwardtiini, em parte	Azeliinae , em parte

Figuras

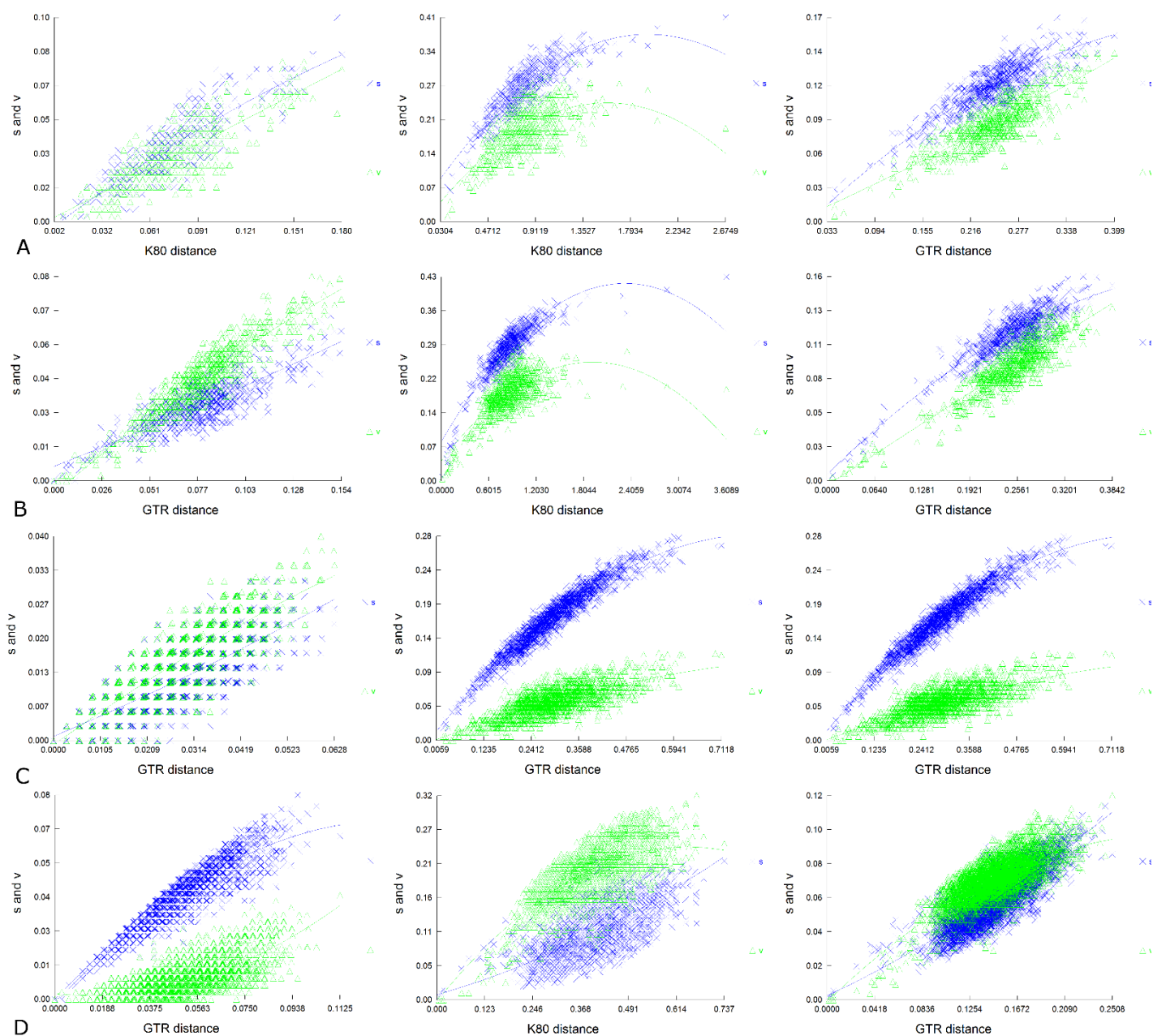


Figura 1. *Plots* de saturação. A primeira coluna de gráficos representa as 1^{as} e 2^{as} posições dos códons, a segunda coluna as 3^{as} e a última as três posições. A: AATS, B: CAD, C: EF1 α , D: CO1. Em azul estão representadas as transições e em verde as transversões.

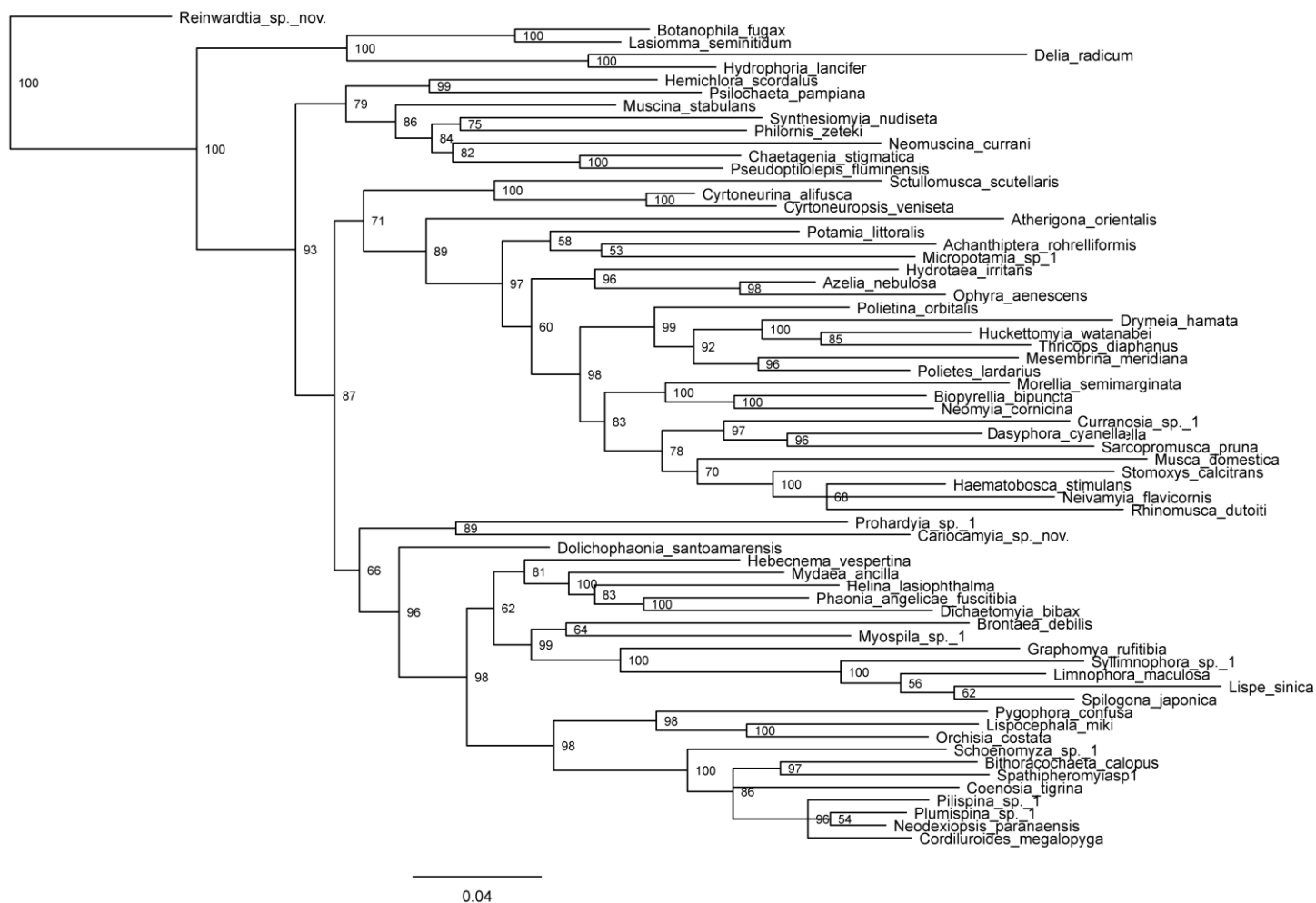


Figura 2. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento 'SP_RED' obtidas pela PPB. Raiz omitida.

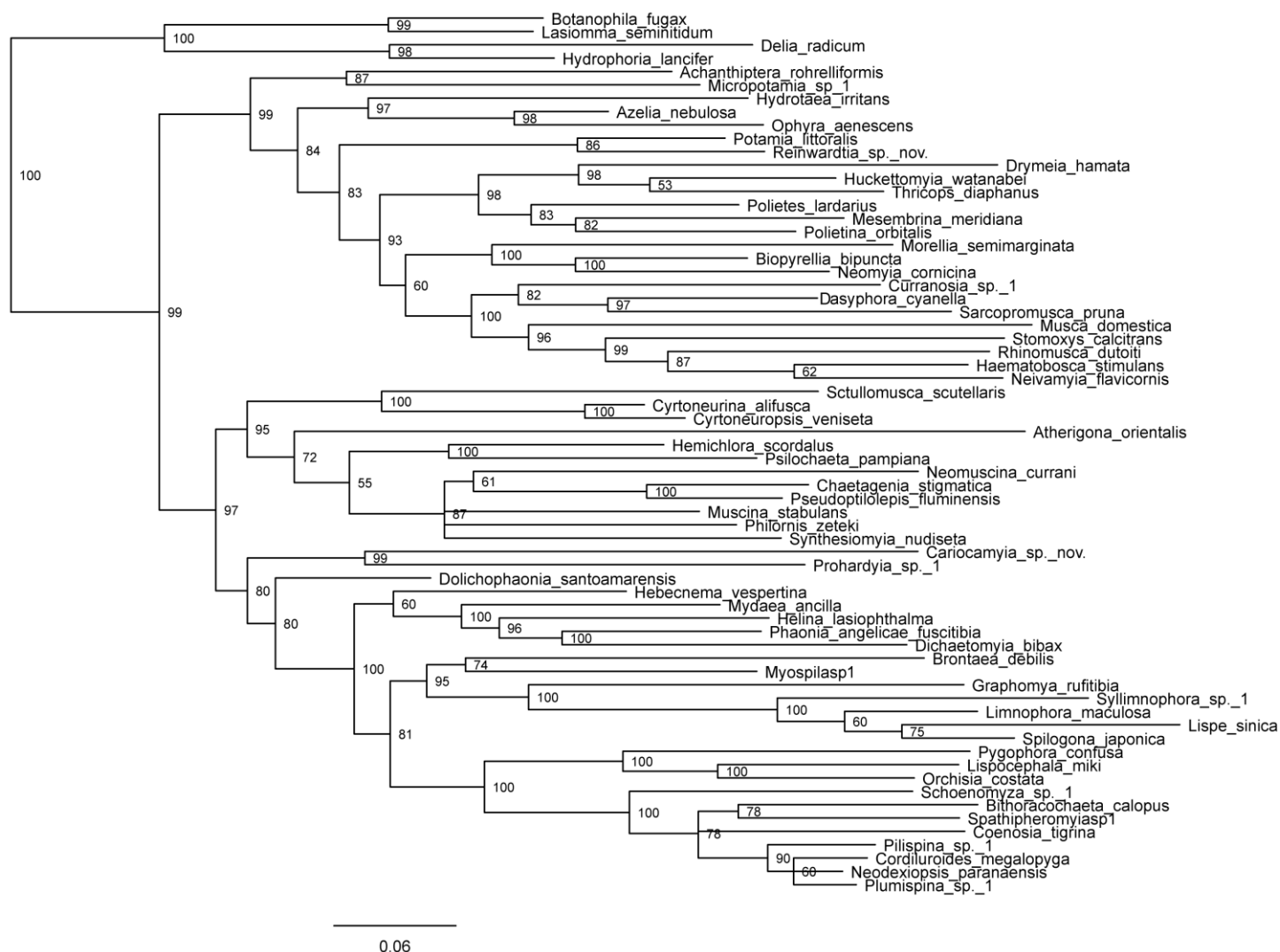


Figura 3. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento 'GENE_RED' obtidas pela PPB. Raiz omitida.

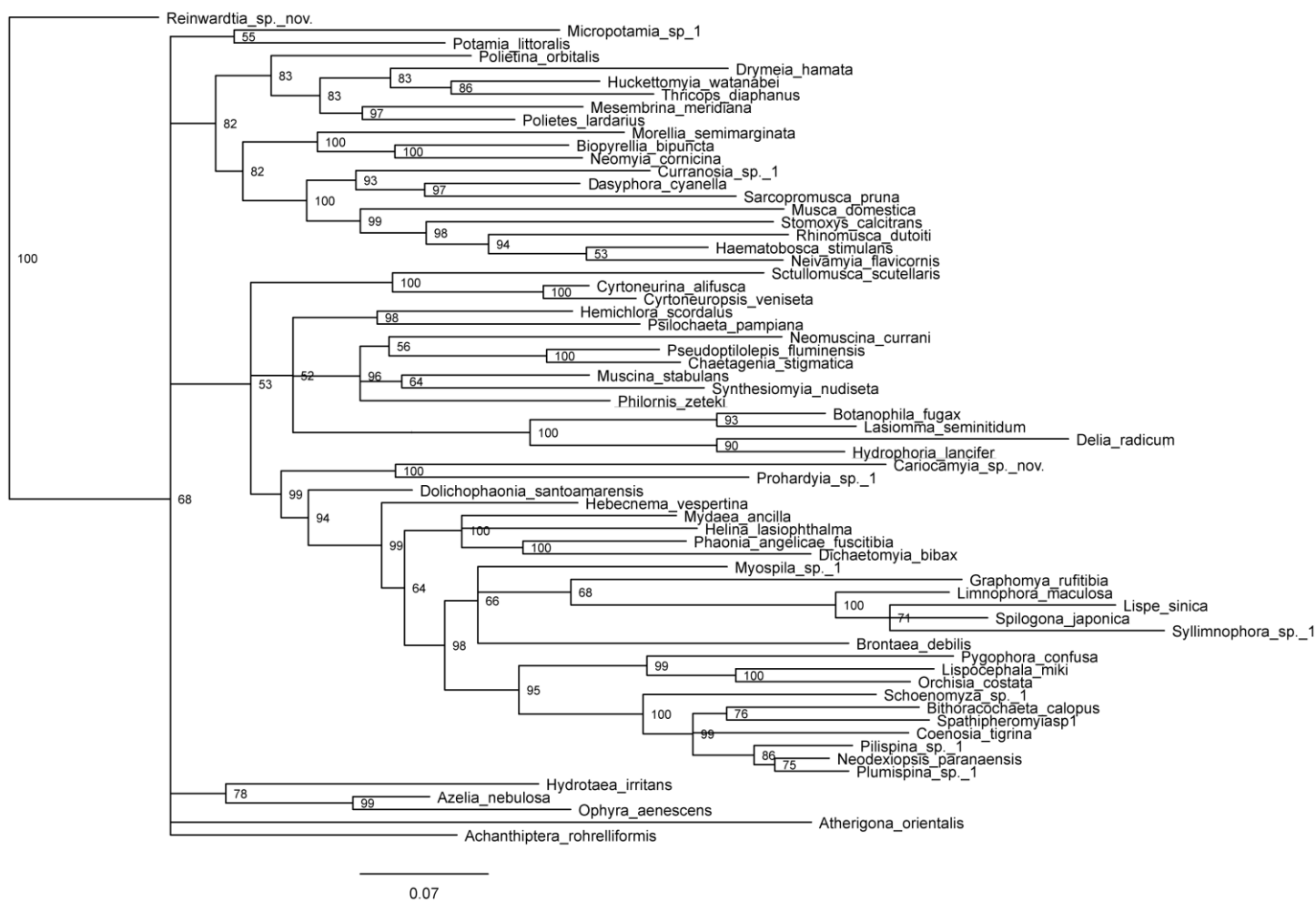


Figura 4. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘GENE123_RED’ obtidas pela PPB. Raiz omitida.

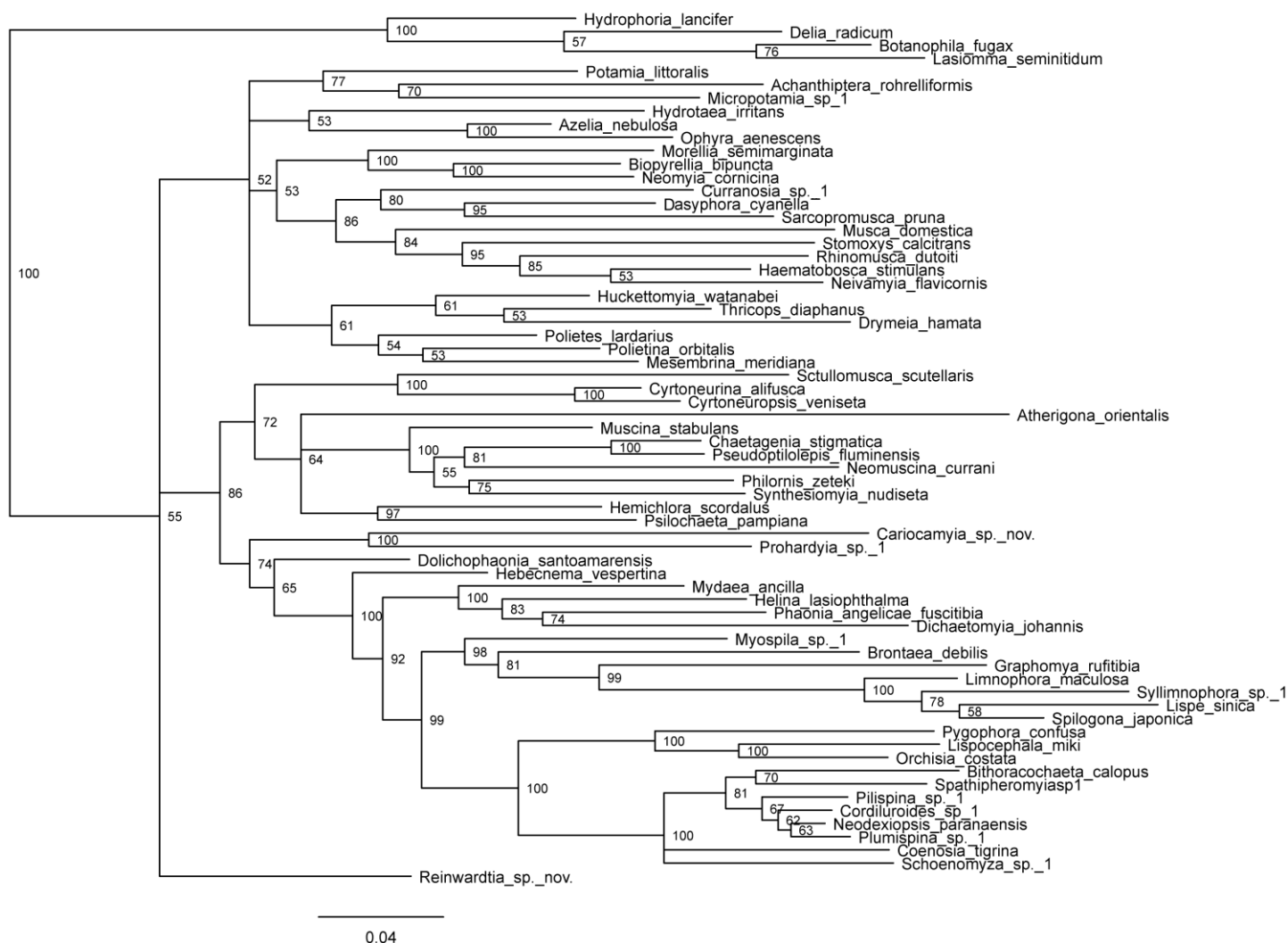


Figura 5. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento 'CO1s3_RED' obtidas pela PPB. Raiz omitida.

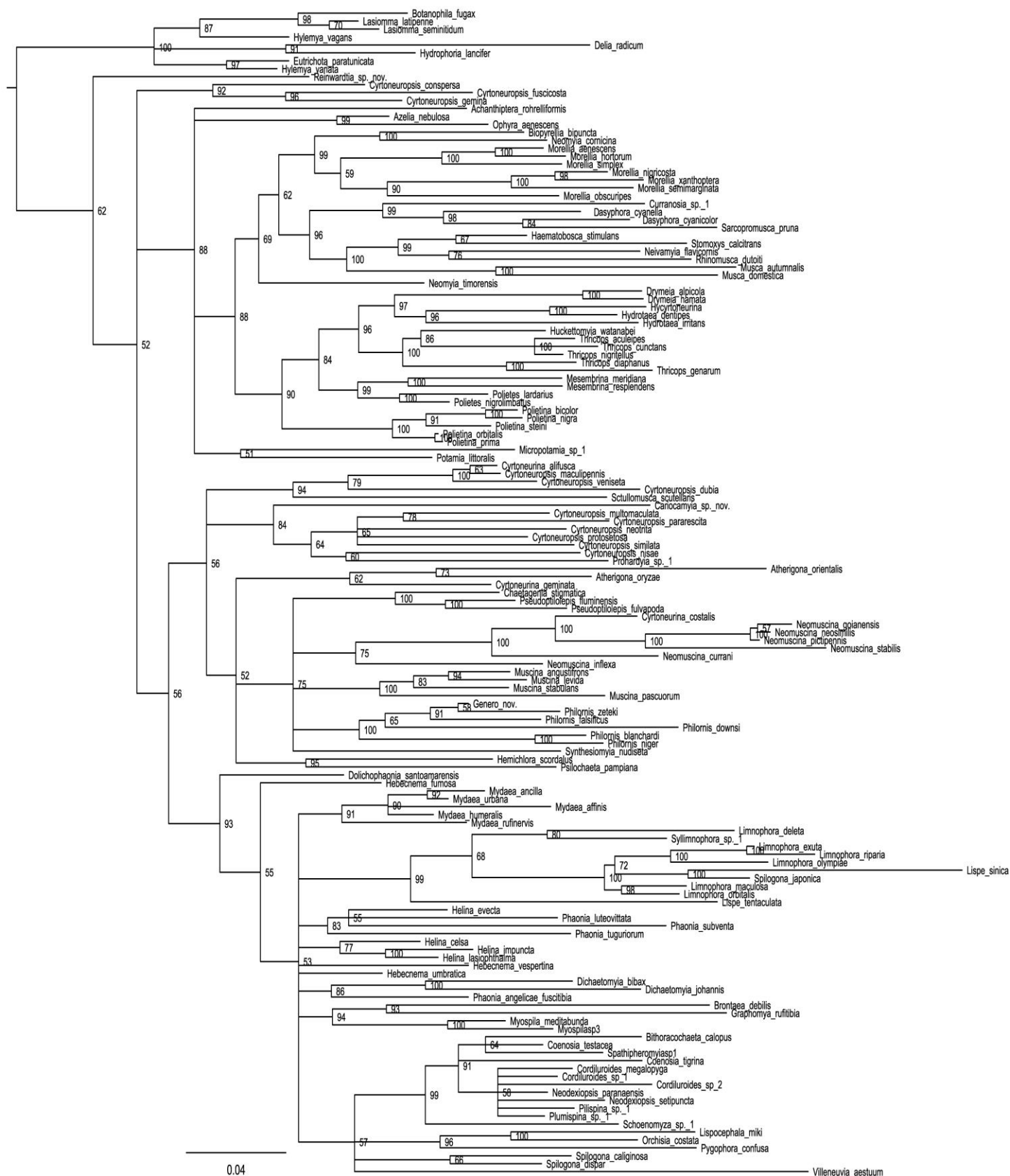


Figura 6. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘SP_COMP’ obtidas pela a PPB. Raiz omitida.

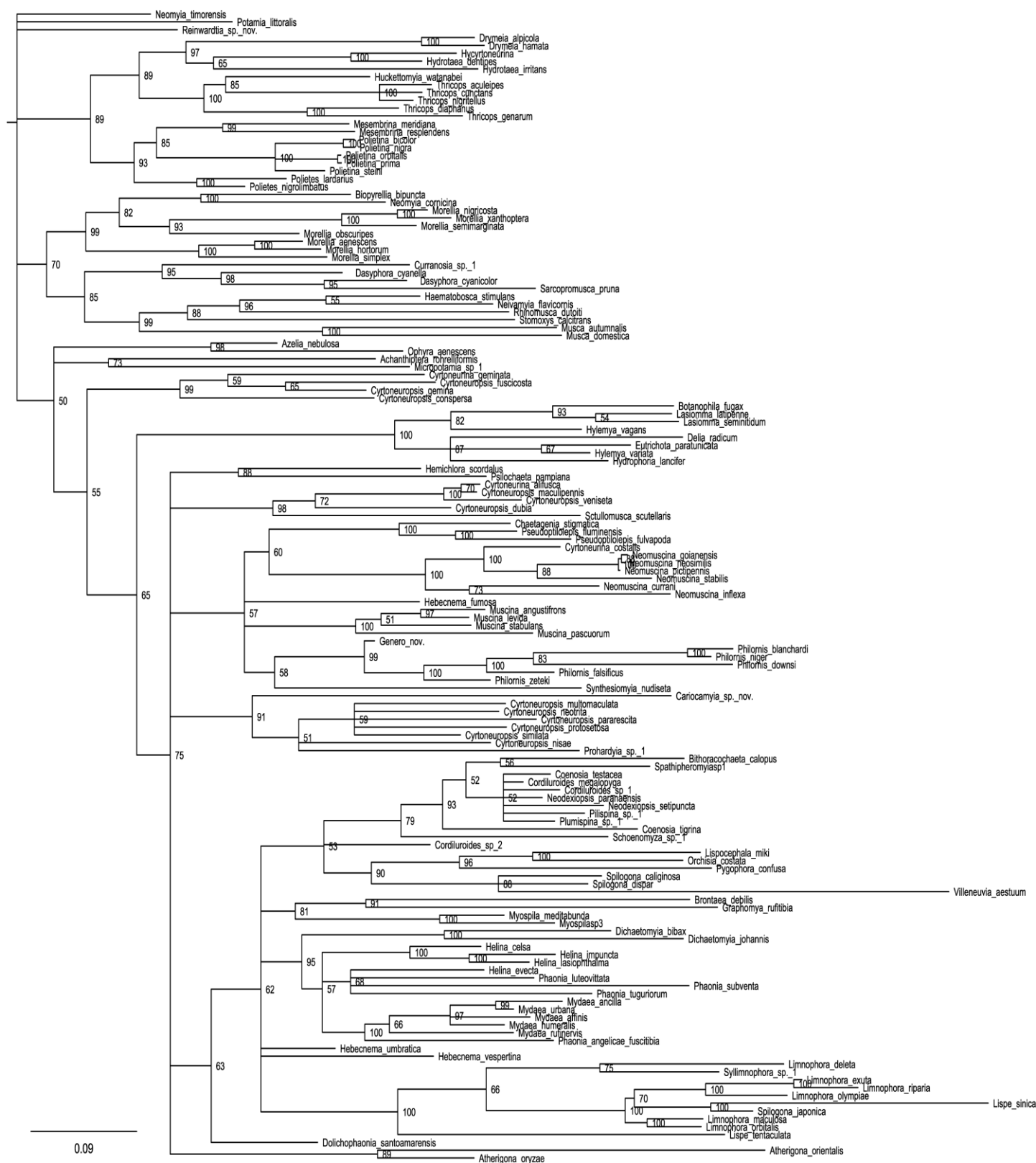


Figura 7. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento 'GENE_COMP' obtidas pela a PPB. Raiz omitida.

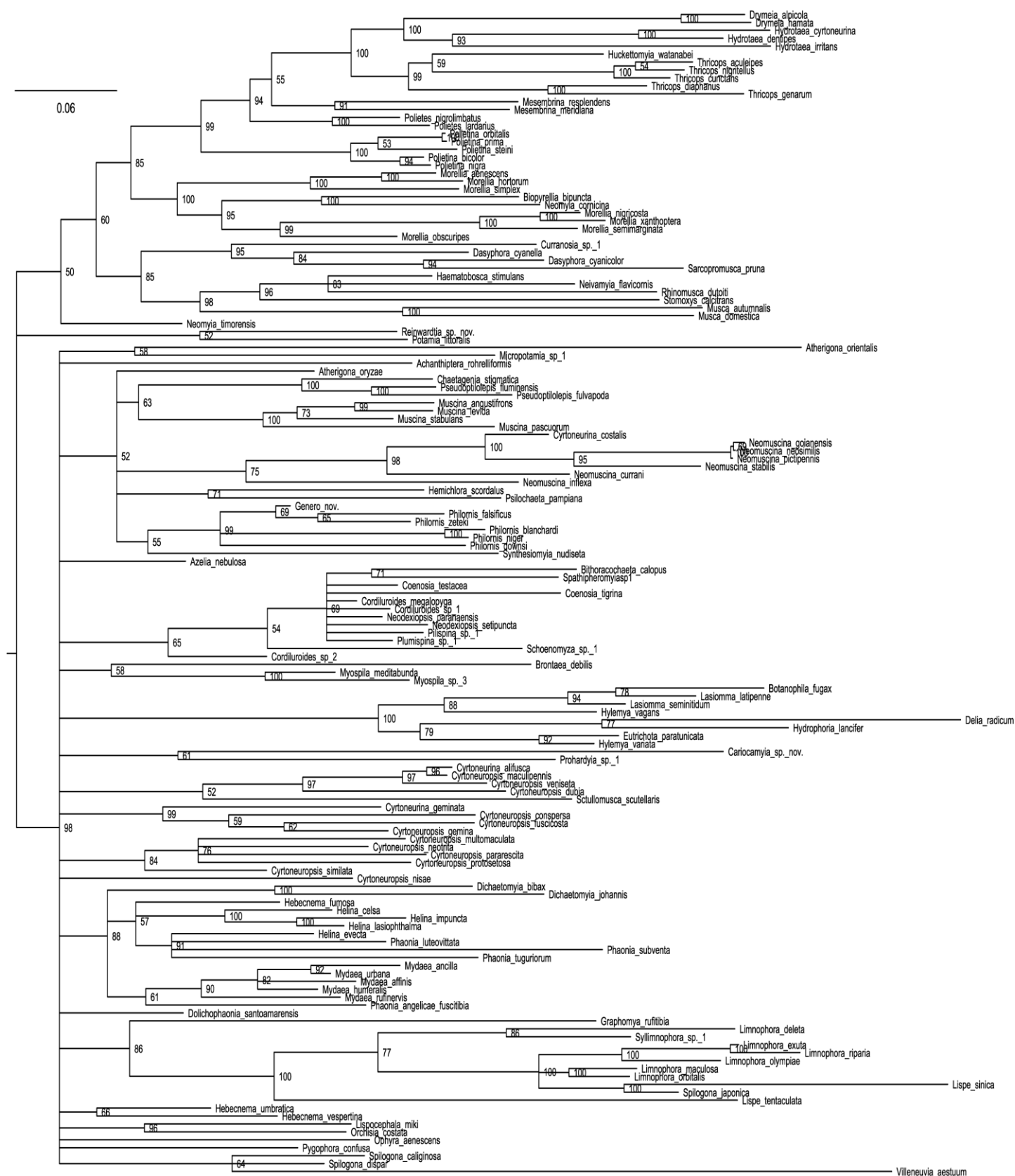


Figura 8. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘GENE123_COMP’ obtidas pela a PPB. Raiz omitida.



Figura 9. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e probabilidades posteriores para o esquema de particionamento ‘CO1s3_COMP’ obtidas pela a PPB. Raiz omitida.

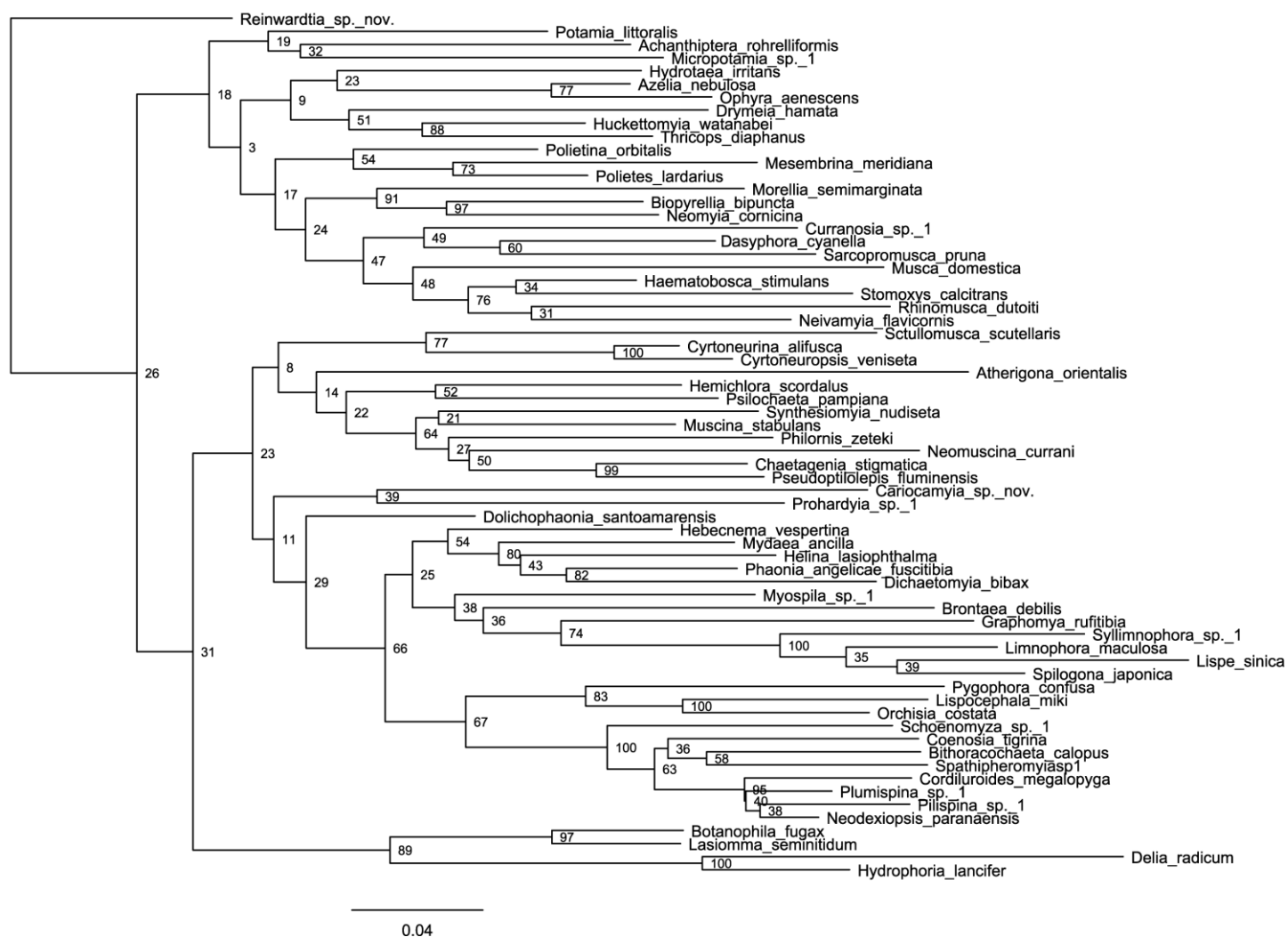


Figura 10. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento 'SP_RED' obtidas pela MV. Raiz omitida; valor de verossimilhança (-lnL) = 38306,01.

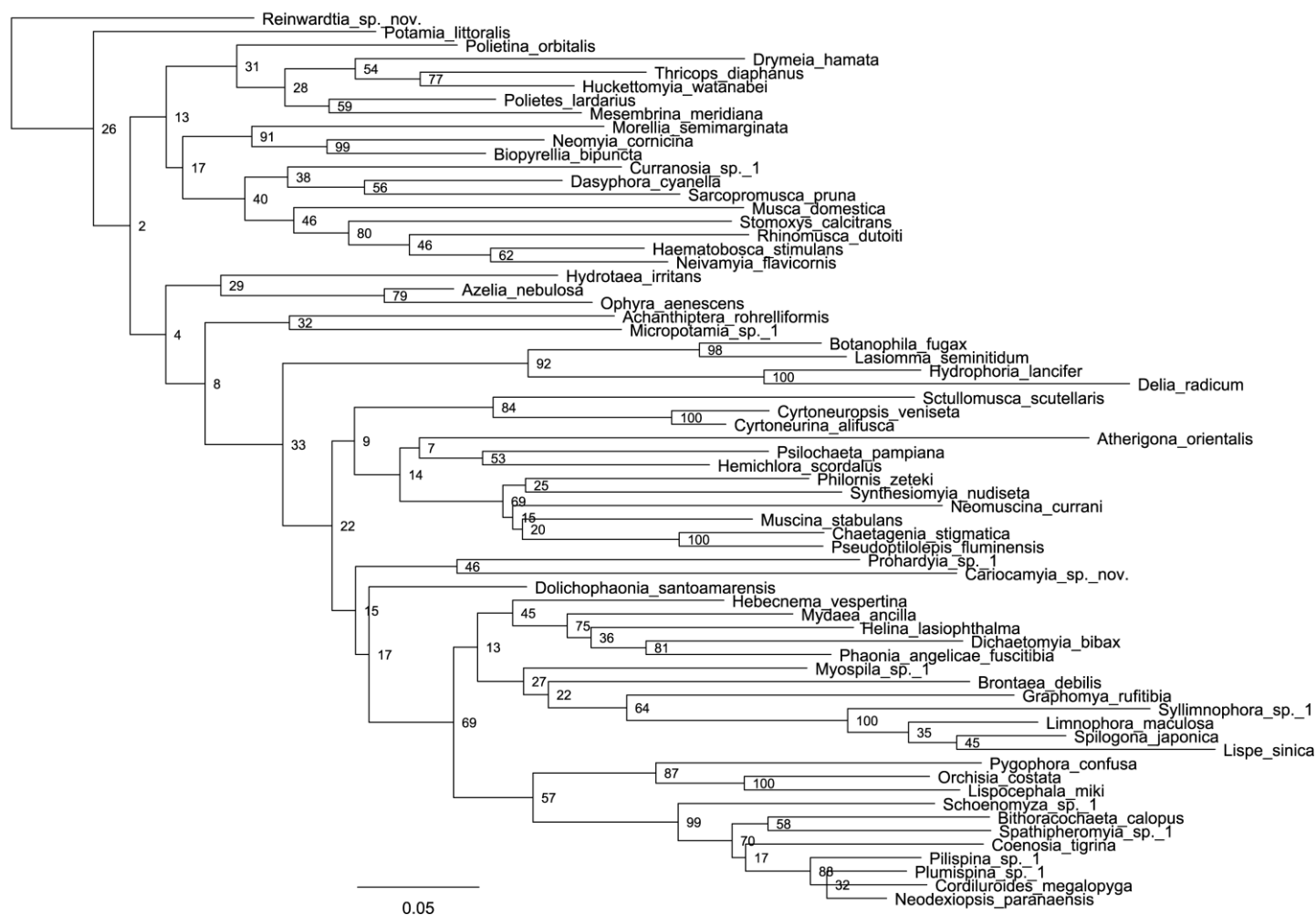


Figura 11. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calypttratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento ‘GENE_RED’ obtidas pela MV. Raiz omitida; valor de verossimilhança (-lnL) = -37802,49.

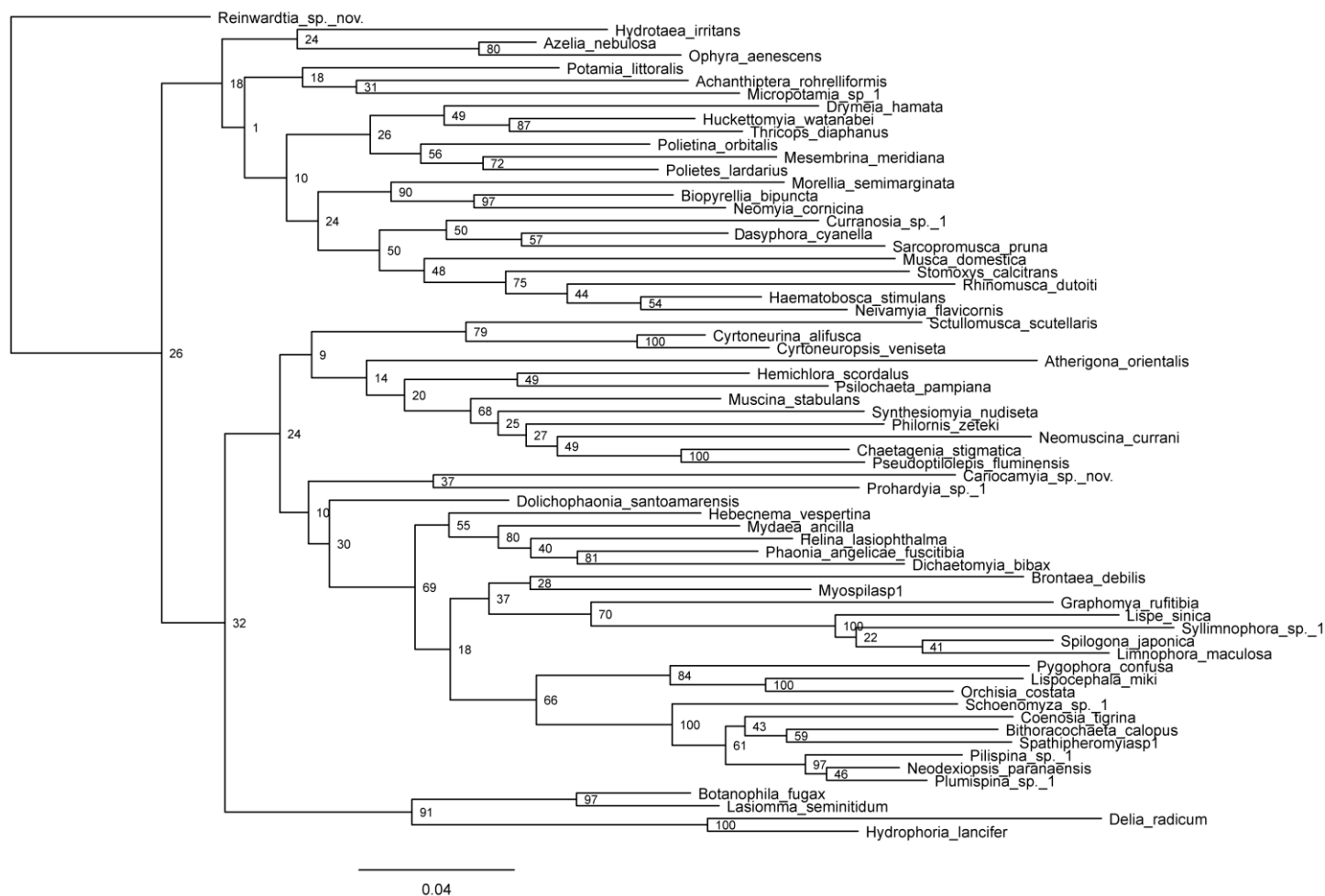


Figura 12. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento 'GENE123_RED' obtidas pela MV. Raiz omitida; valor de verossimilhança (-lnL) = 39515,77.

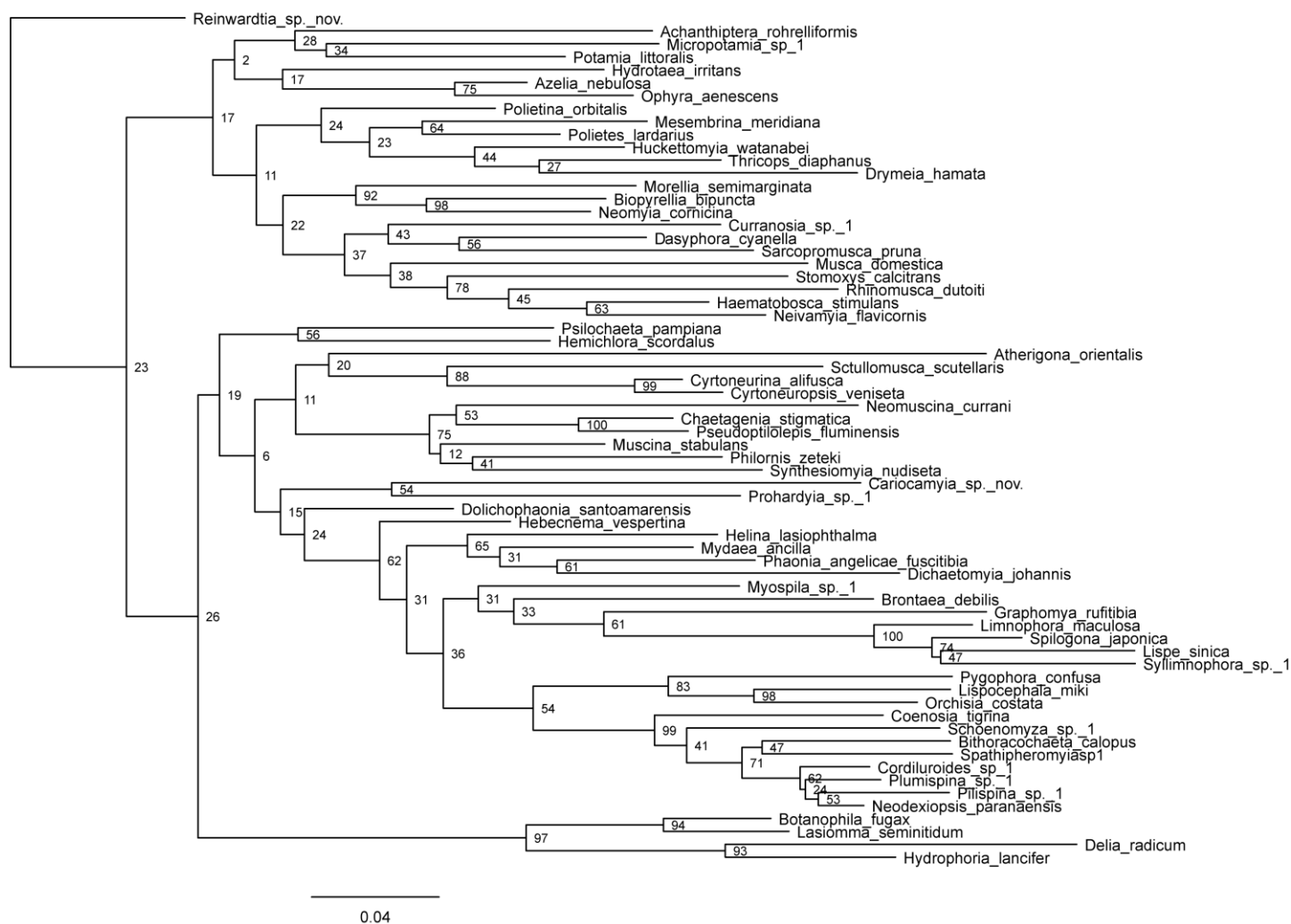


Figura 13. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento ‘CO1s3_RED’ obtidas pela MV. Raiz omitida; valor de verossimilhança (-lnL) = 31184,12.

Figura 14. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calypratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento ‘SP_COMP’ obtidas pela MV. Raiz omitida; valor de verossimilhança (-lnL) = 53899,05.

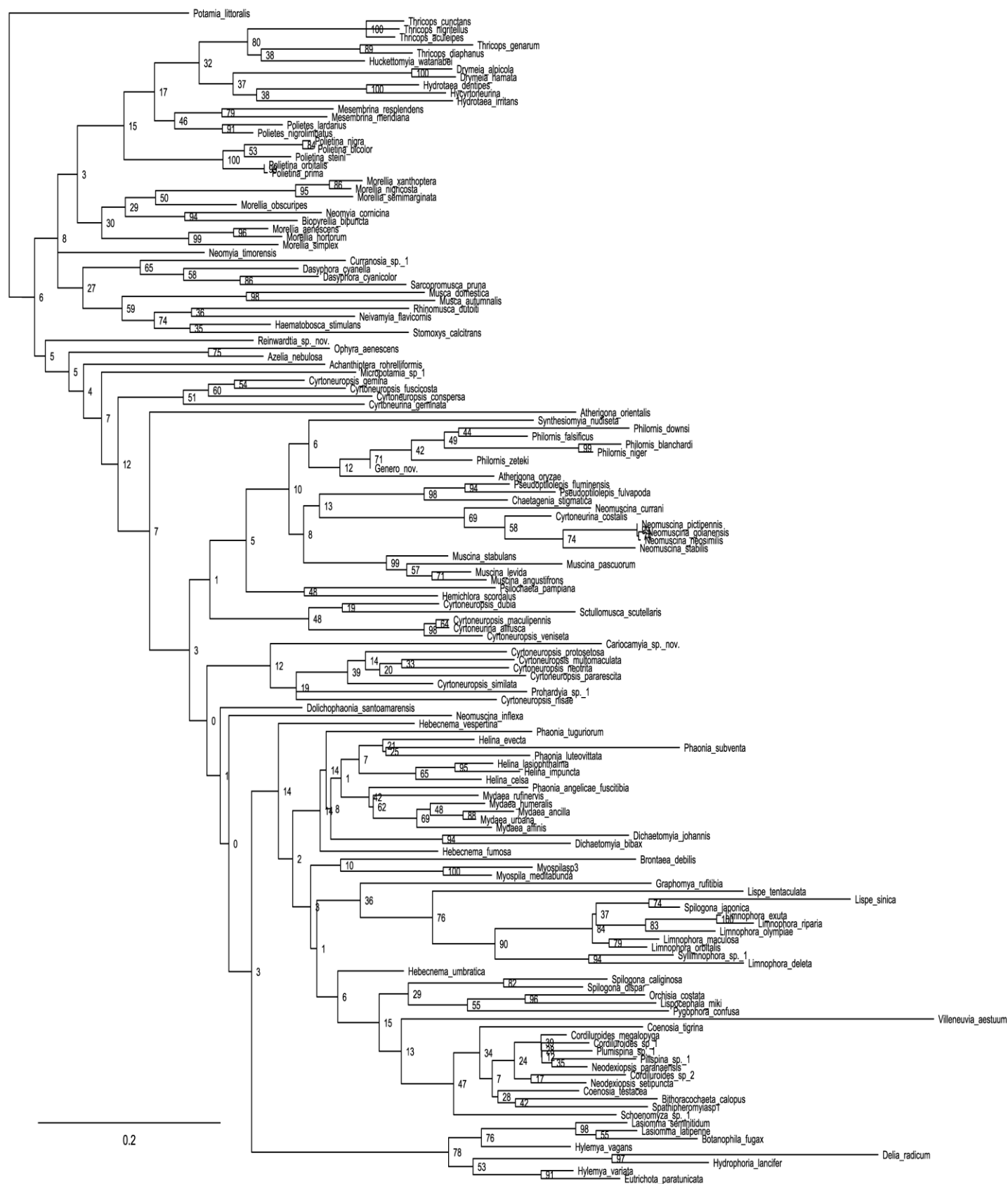


Figura 15. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calypttratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento ‘GENE_COMP’ obtidas pela MV. Raiz omitida; valor de verossimilhança (-lnL) = 52706,91.

Figura 16. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento ‘GENE123_COMP’ obtidas pela MV. Raiz omitida; valor de verossimilhança ($-\ln L$) = 54468,11.

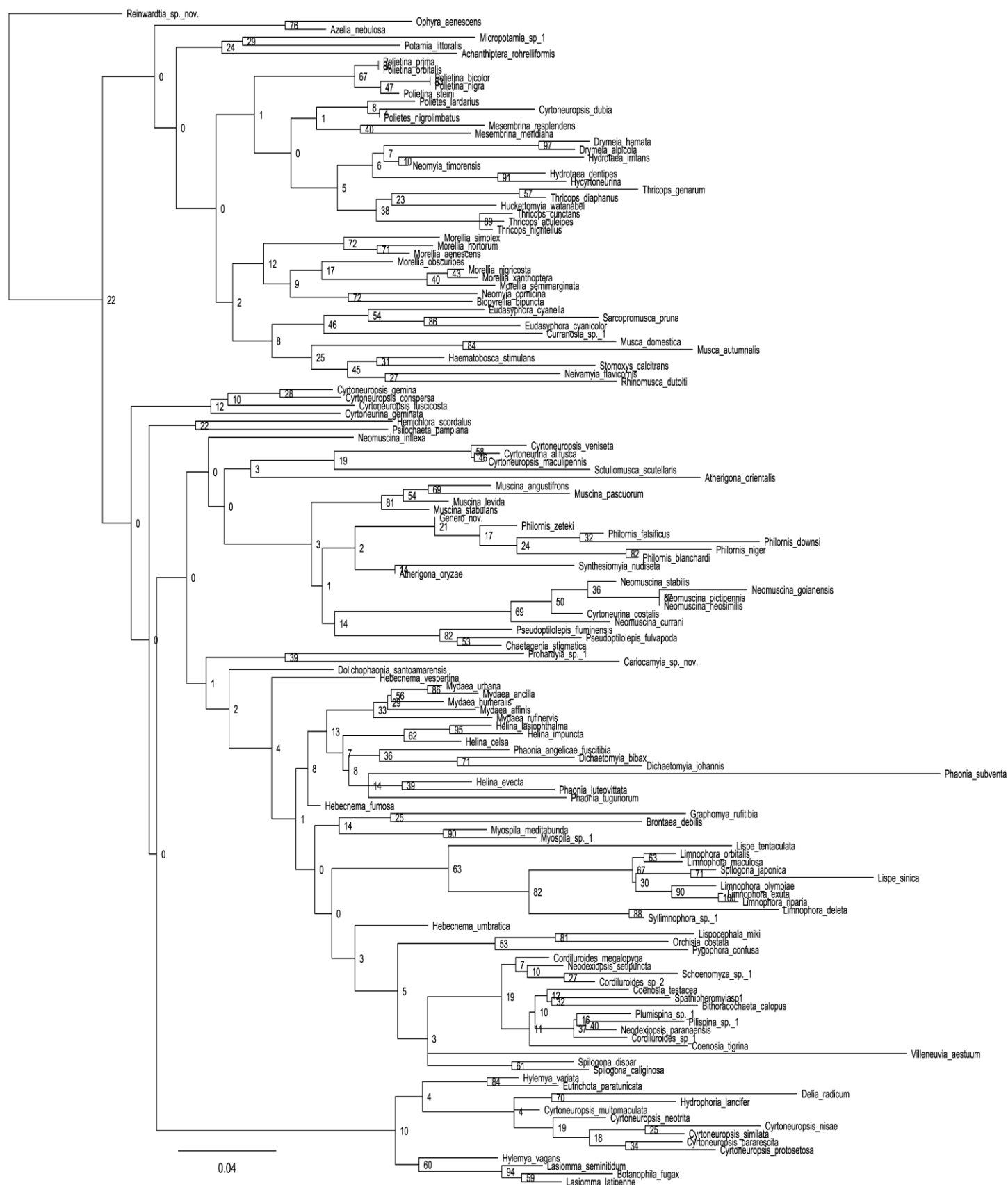


Figura 17. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento 'CO1s3_COMP' obtidas pela MV. Raiz omitida; valor de verossimilhança (-lnL) = 39382,84.

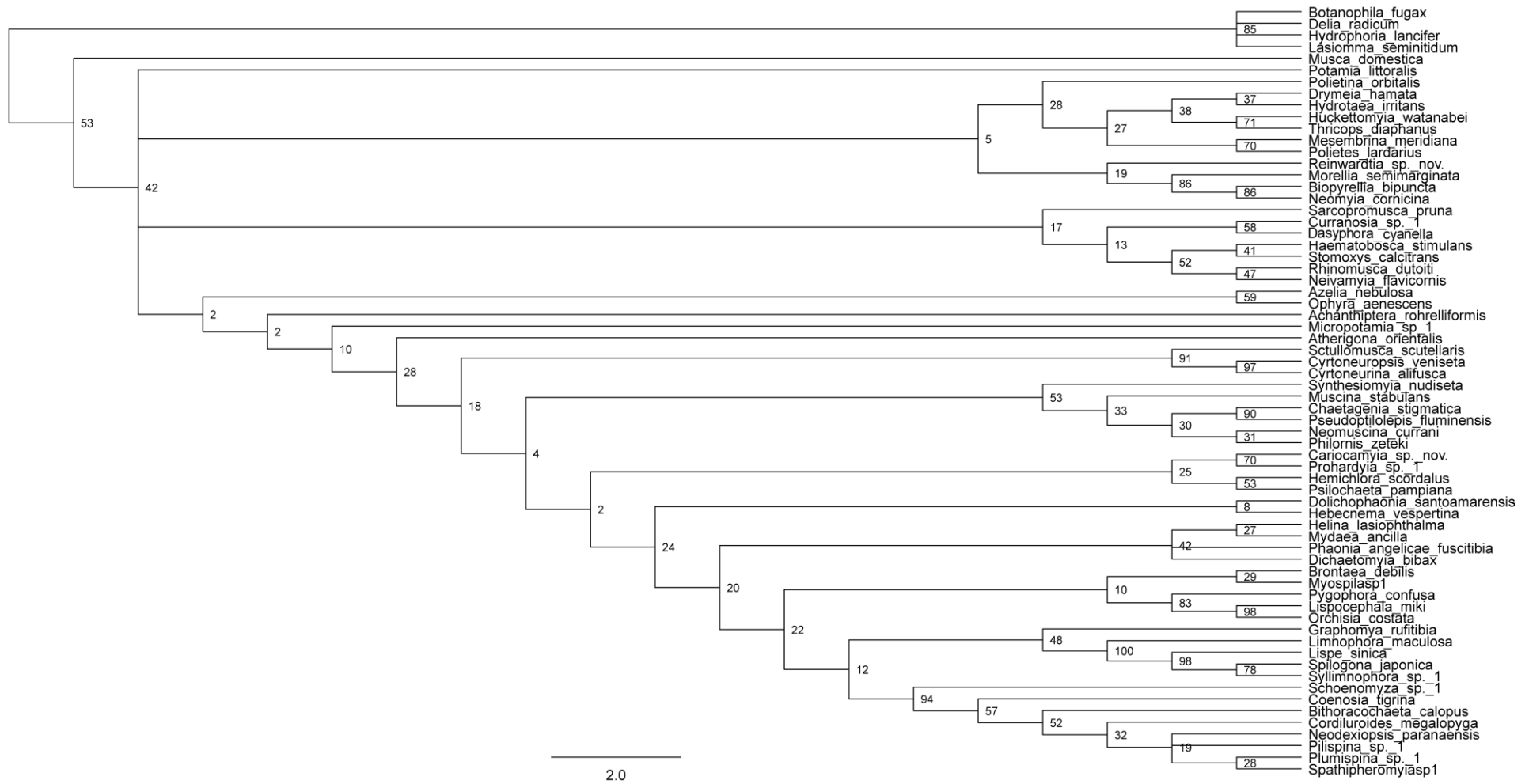


Figura 18. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calypttratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento ‘SP_RED’ obtidas pela Pa. Raiz omitida.

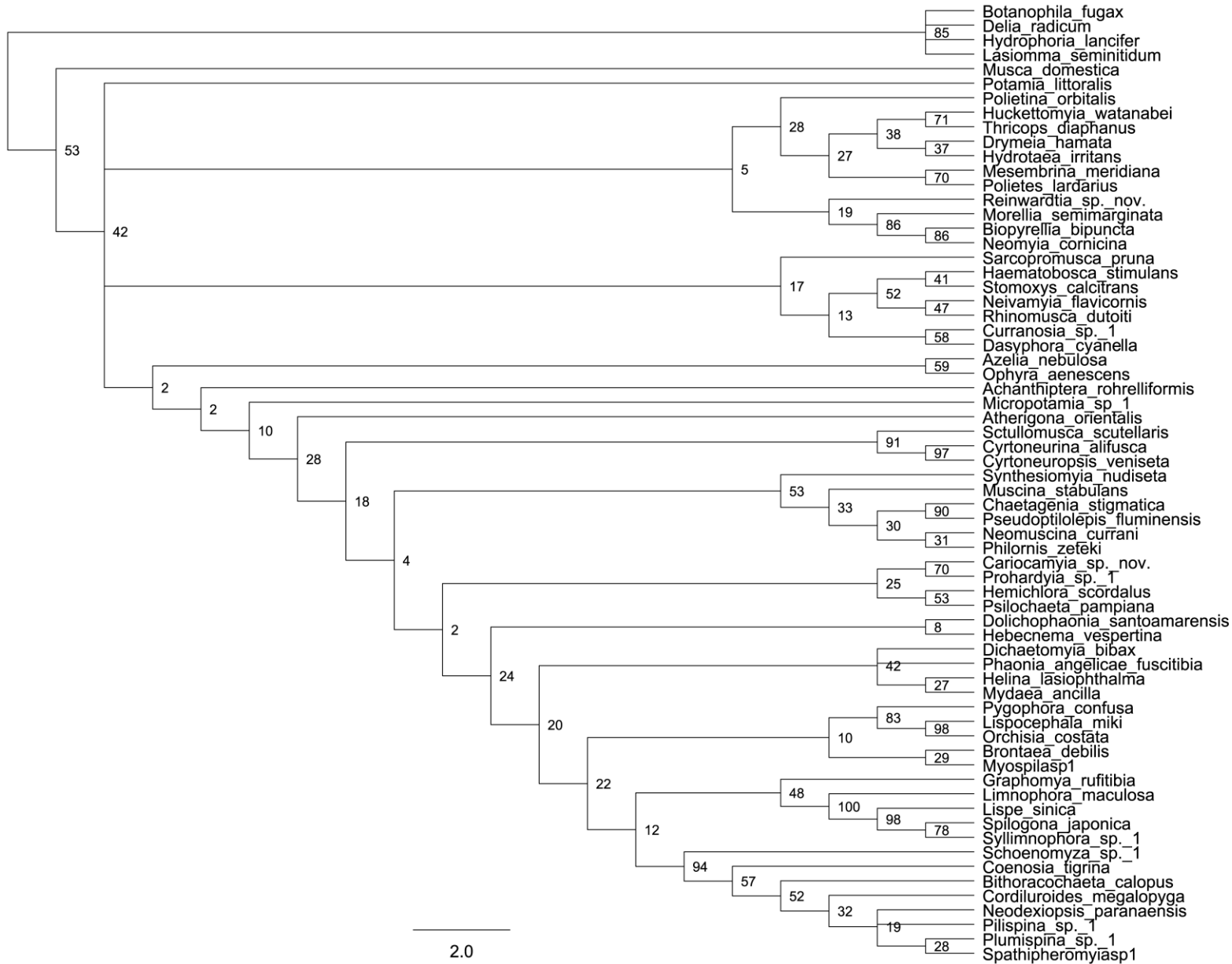


Figura 19. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento 'CO1s3_RED' obtidas pela Pa. Raiz omitida.

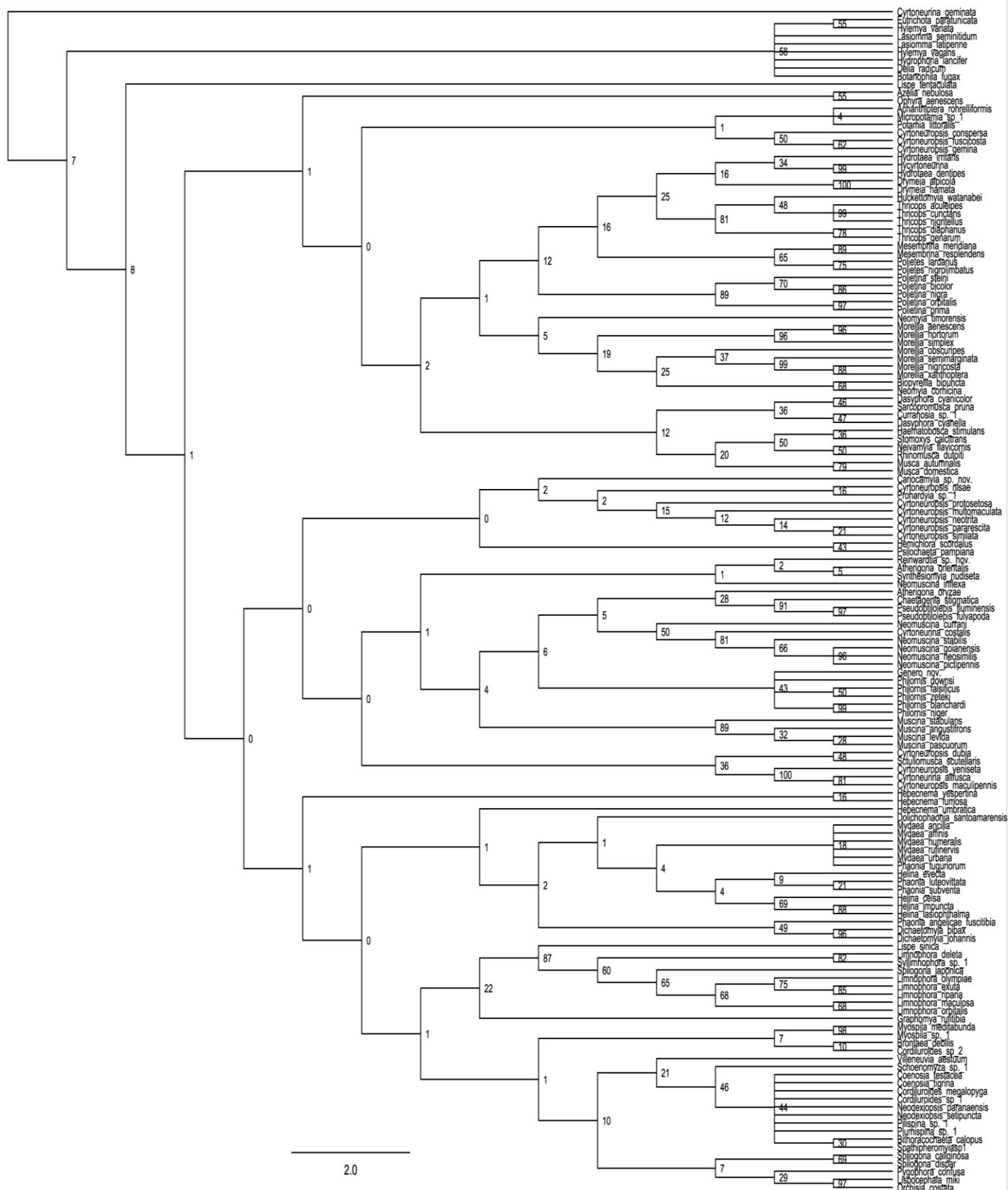


Figura 20. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calypttratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento 'SP_COMP' obtidas pela Pa. Raiz omitida.

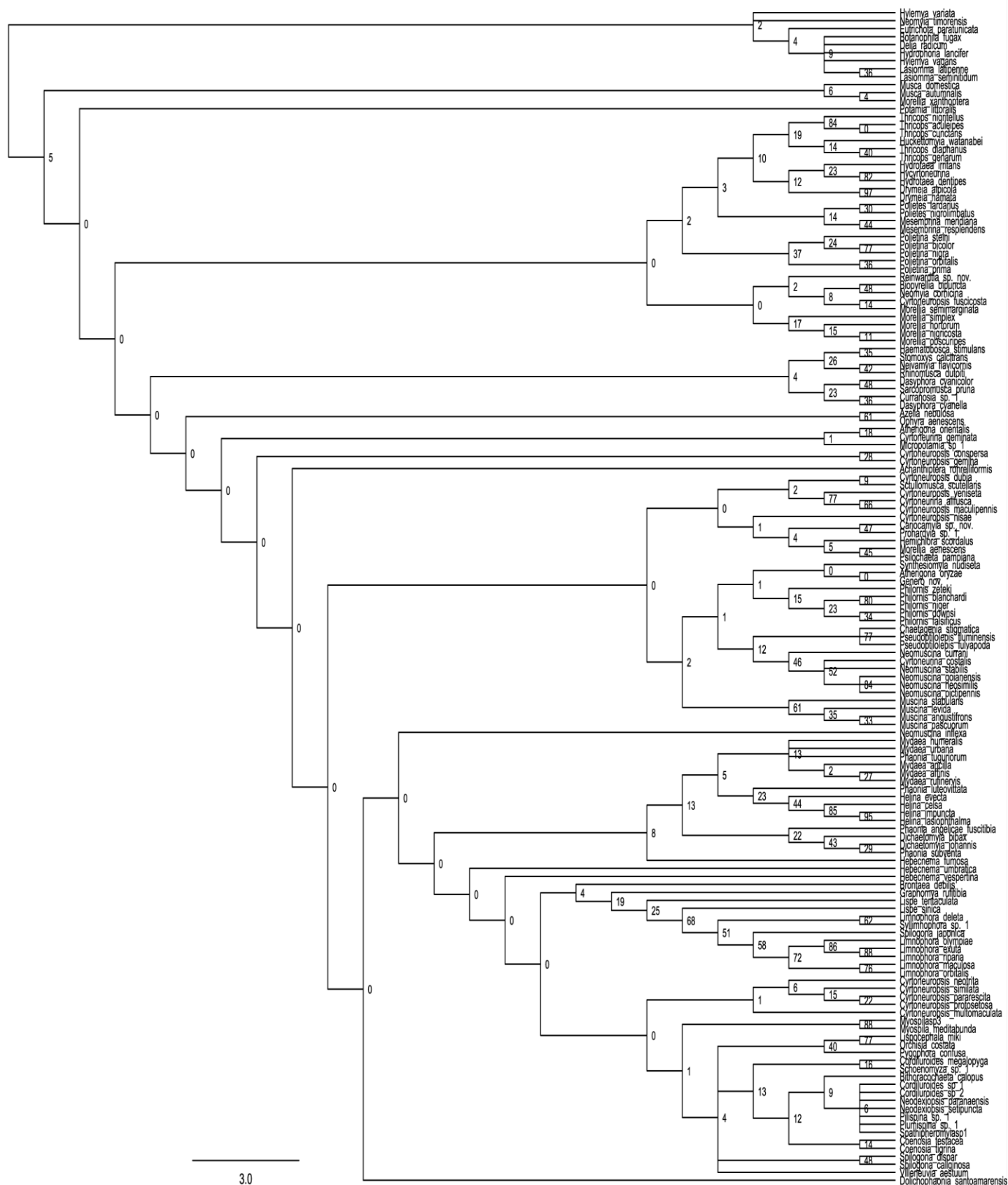


Figura 21. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae e valores de *bootstrap* para o esquema de particionamento ‘CO1s3_COMP’ obtidas pela Pa. Raiz omitida

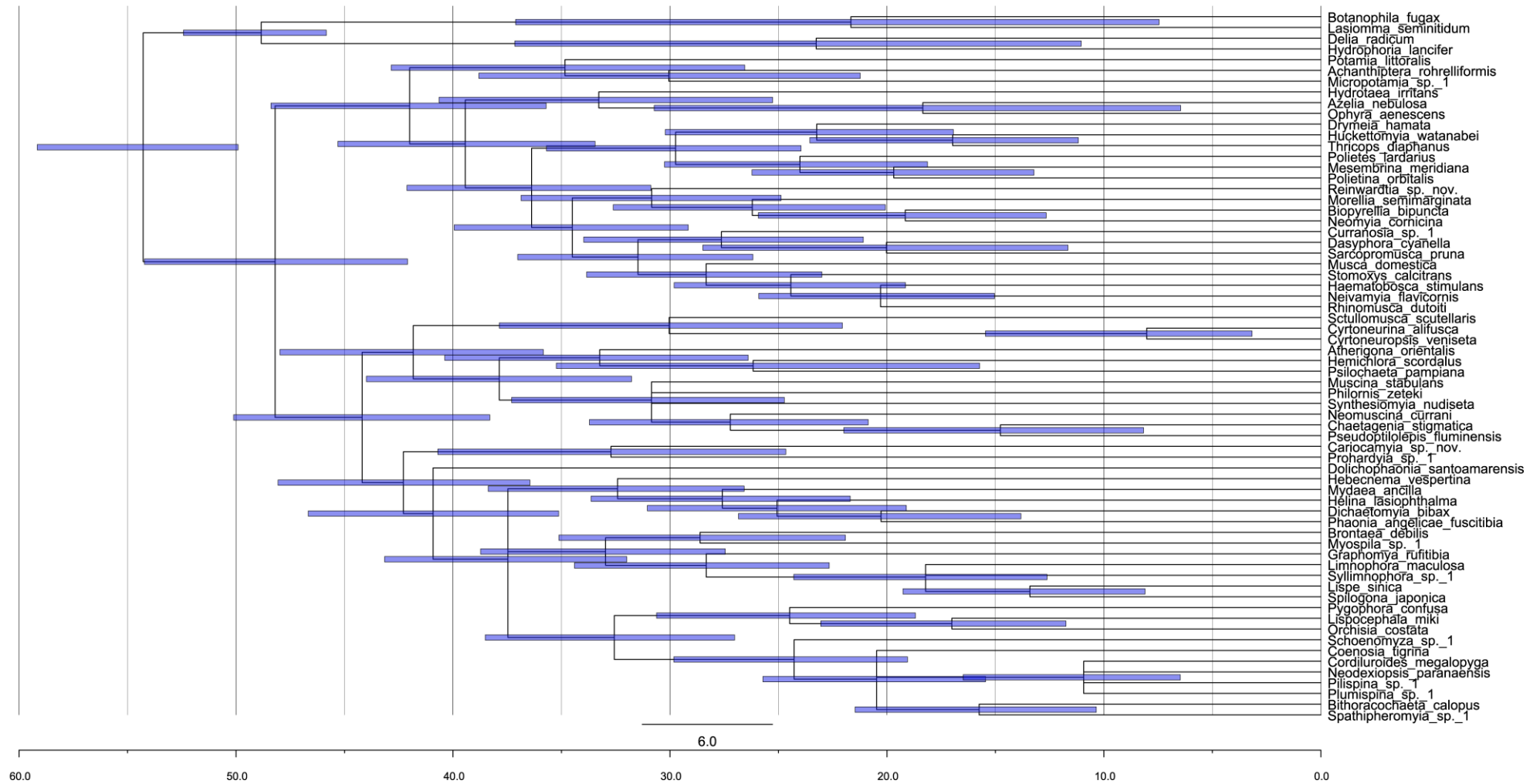


Figura 22. Hipótese filogenética para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calypttratae e intervalos de 95% de confiança para os tempos de divergência obtidos com o esquema de particionamento 'GENE_RED'. Raiz omitida.

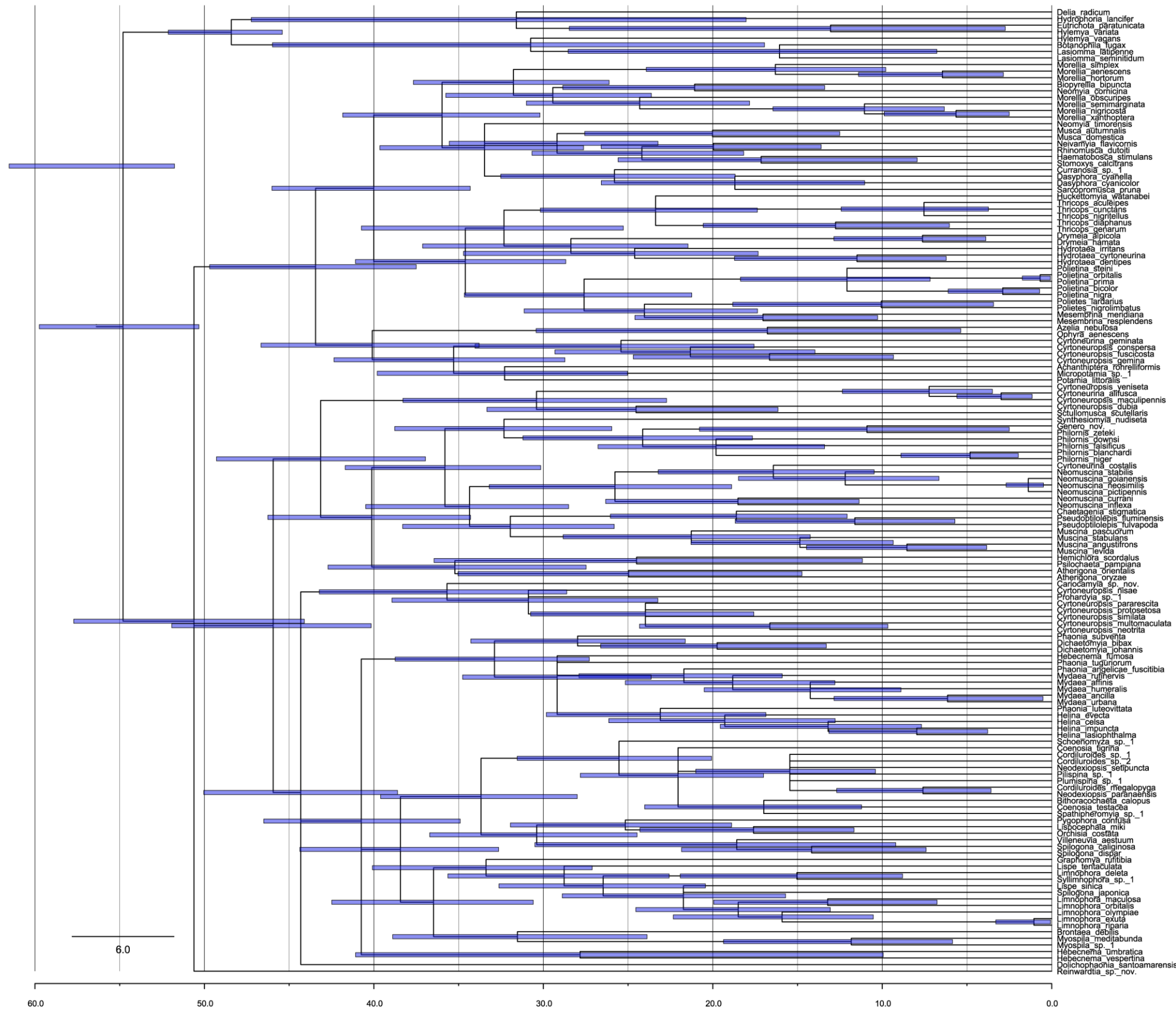


Figura 23. Hipótese filogenética para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calypttratae e intervalos de 95% de confiança para os tempos de divergência obtidos com o esquema de particionamento 'GENE_COMP'. Raiz omitida.

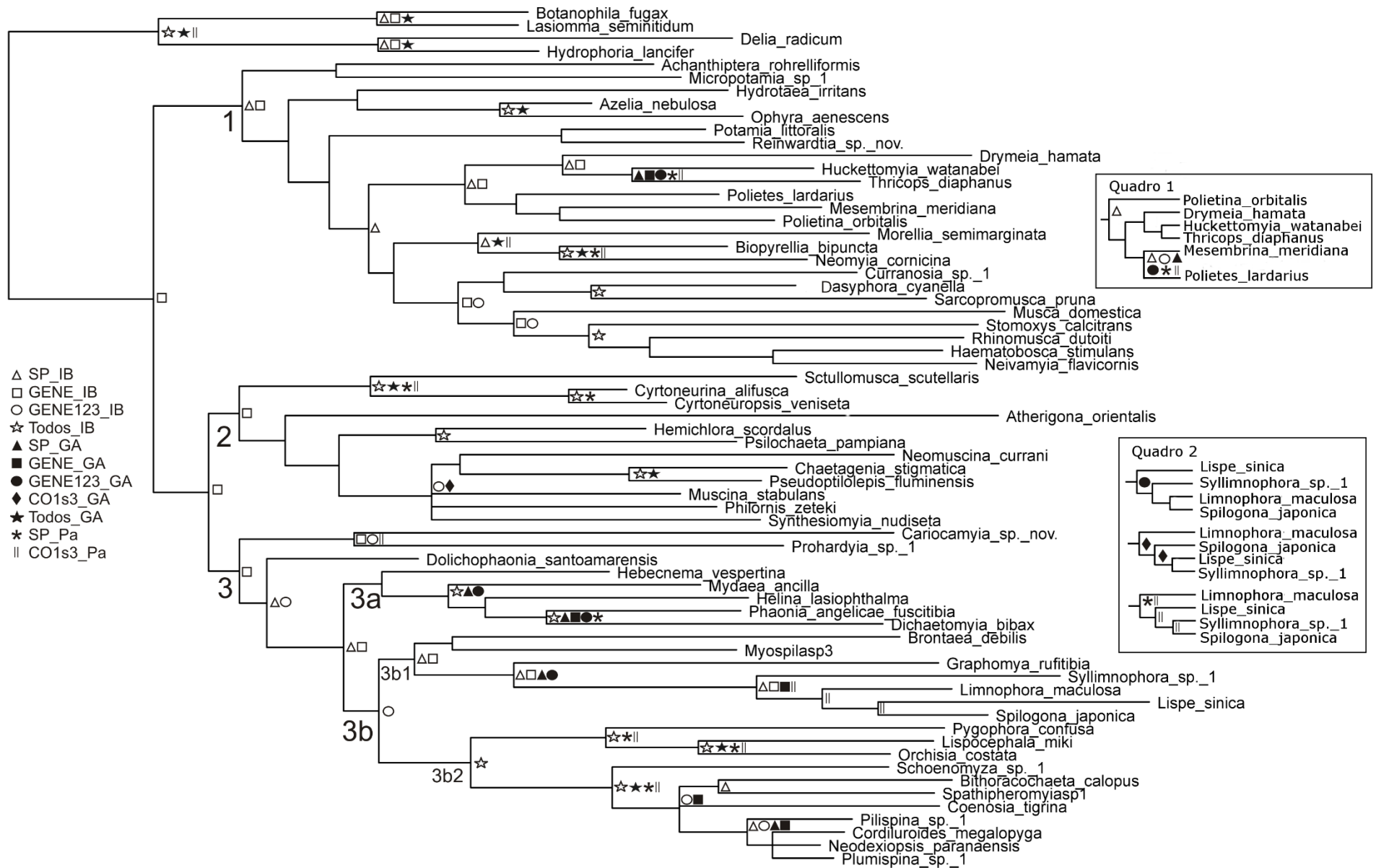


Figura 24. Resumo dos suportes obtidos por todas as análises que convergiram, para as relações entre 62 espécies de Muscidae e cinco espécies de outras famílias de Calyptratae, mapeados sobre a hipótese filogenética obtida pelo esquema de particionamento ‘GENE’, pela PPB. Raiz omitida.

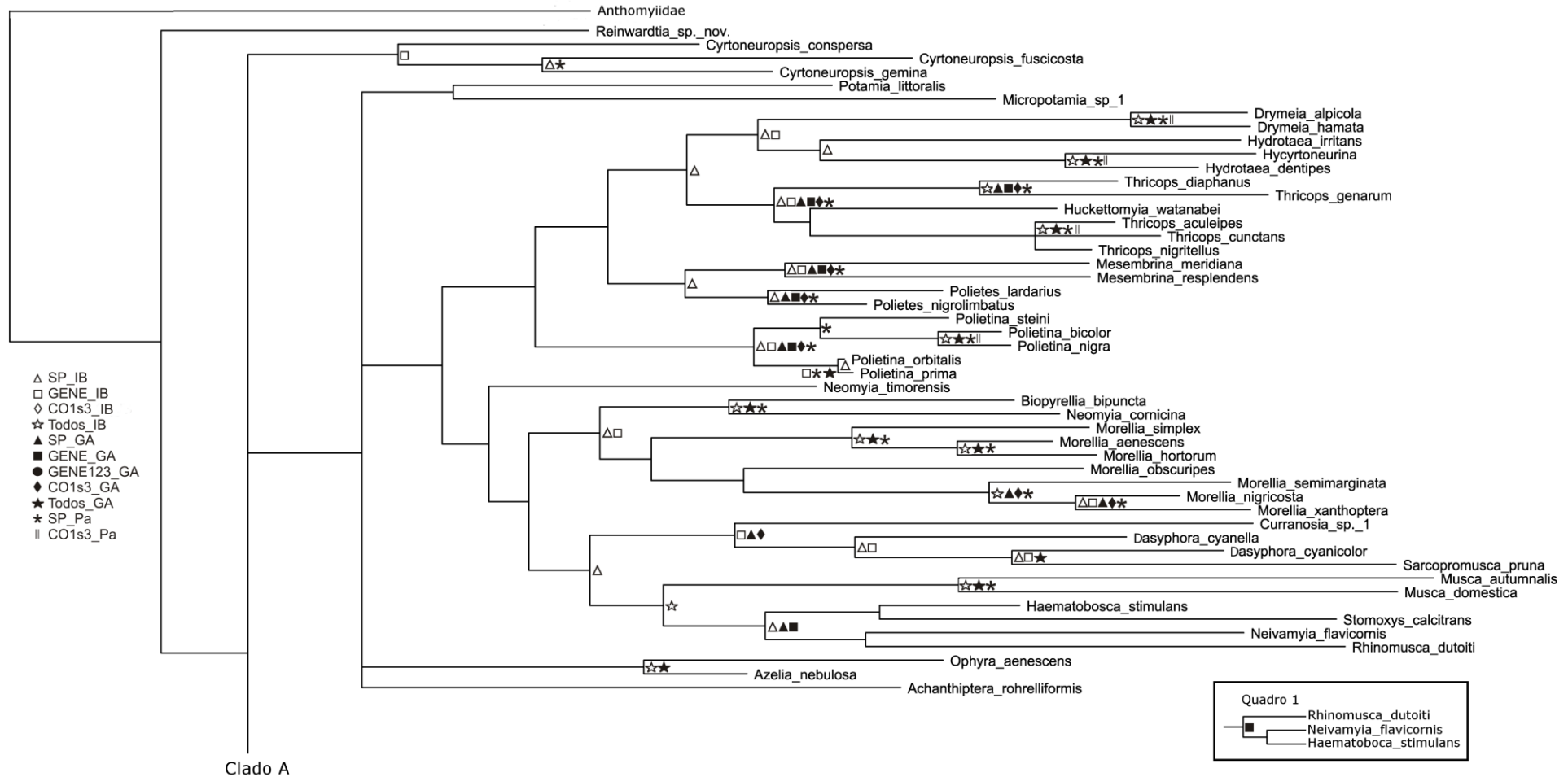


Figura 25a. Resumo dos suportes obtidos por todas as análises que convergiram, para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae, mapeados sobre a hipótese filogenética obtida pelo esquema de particionamento ‘SP’, pela PPB. Raiz omitida e clado dos Anthomyiidae resumido.

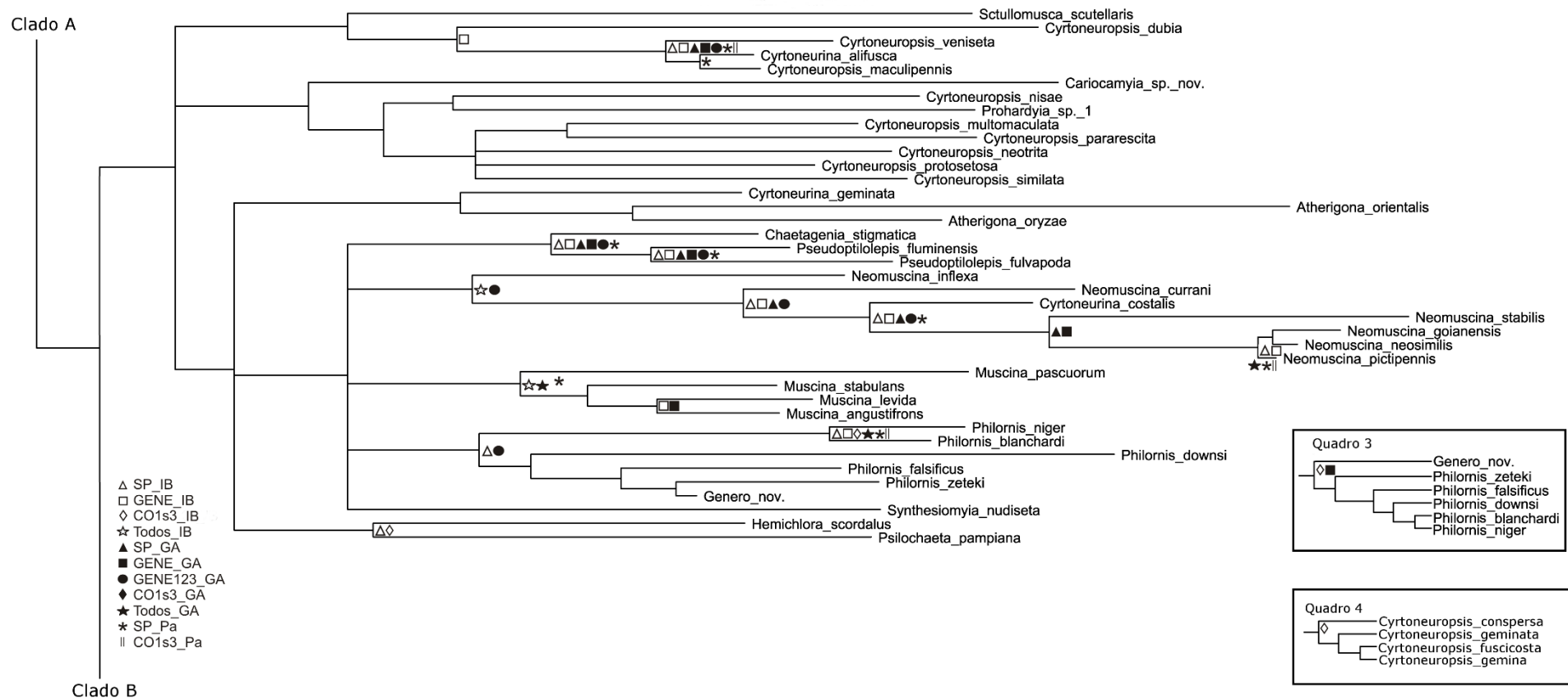


Figura 25b. Resumo dos suportes obtidos por todas as análises que convergiram, para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae, mapeados sobre a hipótese filogenética obtida pelo esquema de particionamento ‘SP’, pela PPB.

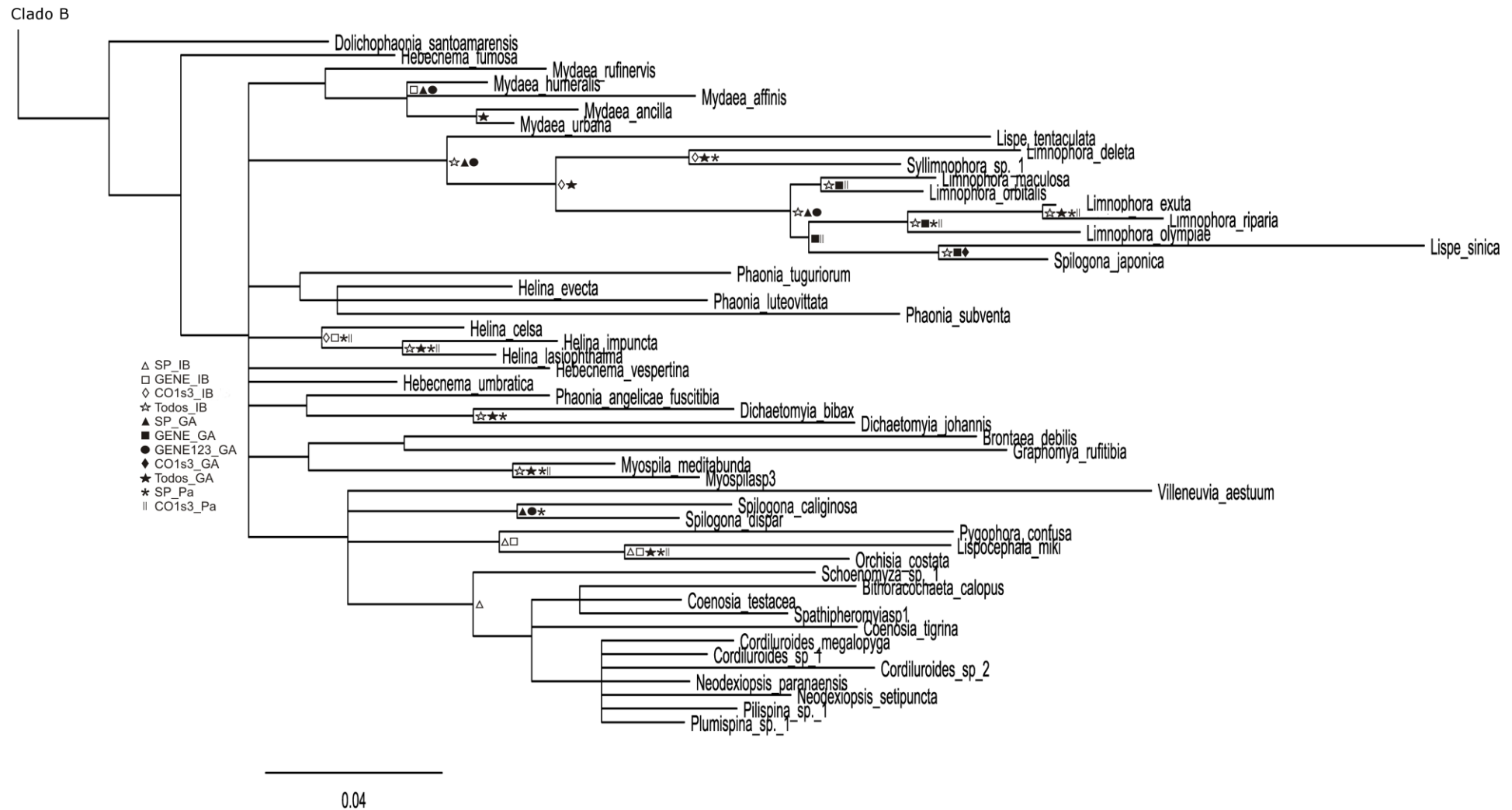


Figura 25c. Resumo dos suportes obtidos por todas as análises que convergiram, para as relações entre 138 espécies de Muscidae e 10 espécies de outras famílias de Calyptratae, mapeados sobre a hipótese filogenética obtida pelo esquema de particionamento ‘SP’, pela PPB.

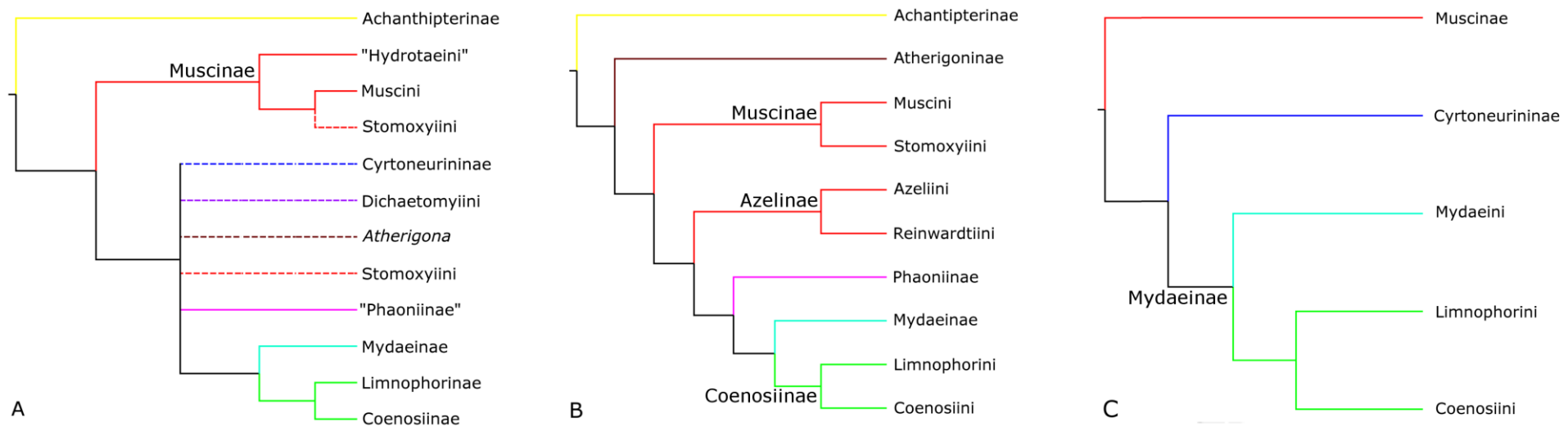


Figura 26. Figuras esquemáticas representando as principais hipóteses filogenéticas para Muscidae. A. Hennig (1965), onde as linhas pontilhadas representam grupos de posicionamento incerto, e aqueles apresentados entre aspas são os apontados pelo autor como agrupamentos não monofiléticos. Hydrotaeini é equivalente a Azeliini de Carvalho (1989). *Reinwardtia* encontra-se em Muscini e os demais Reinwardtiini em Phaoniinae; B. Carvalho (1989); C. Hipótese deste trabalho, onde Muscinae inclui Achantipterinae, Muscini, Stomoxyini e Azeliini, Cyrtoneurinae inclui Atherigoninae e a maior parte dos Reinwardtiini, e Mydaeini inclui Phaoniinae. Os Mydaeinae, no sentido tradicional, estão dispersos pelos Cyrtoneurinae, Mydaeini e Limnophorini.